

**Physiologische Effekte eines CD73 Knockouts –
Immunophänotypisierung von gesunden Mäusen und die Rolle des
CD73 in der immunologischen Abwehr eines orthotop injizierten
Pankreaskarzinoms**

von Thomas Johannes Adam

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Physiologische Effekte eines CD73 Knockouts – Immunophänotypisierung von gesunden
Mäusen und die Rolle des CD73 in der immunologischen Abwehr eines orthotop injizierten
Pankreaskarzinoms**

**Von Thomas Johannes Adam
aus Dachau**

München 2020

**Aus dem veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierphysiologie**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

**Angefertigt in der Chirurgischen Forschung des Universitätsklinikums Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Mentor: Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 8. Februar 2020

Meiner Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abkürzungsverzeichnis	7
3	Einleitung	13
3.1	Das Immunsystem	13
3.1.1	Angeborenes Immunsystem	13
3.1.1.1	Makrophagen	14
3.1.1.2	Granulozyten	14
3.1.1.3	Mastzellen	14
3.1.1.4	Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC)	15
3.1.1.5	Dendritische Zellen	15
3.1.1.6	Natürliche Killer-Zellen	15
3.1.2	Adaptives Immunsystem	16
3.1.2.1	T-Lymphozyten	16
3.1.2.2	B-Lymphozyten	18
3.1.3	Tumorimmunologie	18
3.2	CD73	20
3.2.1	CD73 und Adenosin im Allgemeinen	20
3.2.2	CD73 und Tumor	22
3.2.3	CD73 Knockout und Inhibition	24
3.3	Pankreaskarzinom	26
3.3.1	Tumorerkrankungen allgemein	26
3.3.2	Das Pankreaskarzinom	26
3.3.3	Risikofaktoren PDAC	27
3.3.4	Diagnostik PDAC	27
3.3.5	Therapie/Heilungsaussichten PDAC	28
3.4	Zielsetzung der Arbeit	29
4	Material & Methoden	31
4.1	Material	31
4.1.1	Durchflusszytometrie (FACS)-Antikörper und Färbungen	31
4.1.2	FACS-Kompensations-Beads und Stimulationspräparate	32
4.1.3	Laborgeräte	33
4.1.4	Lösungen und Flüssigkeiten	34
4.1.5	OP-Material	35

4.1.6	PCR.....	36
4.1.7	Pharmaka.....	36
4.1.8	Verbrauchsmaterial	37
4.1.9	Zytokine	38
4.1.10	Bio-Plex.....	39
4.1.11	Software	39
4.2	Methoden.....	40
4.2.1	Zellkultur.....	40
4.2.1.1	Erstellen der Zellkultur der Panc02-Zelllinie	40
4.2.1.2	Passagieren der Panc02-Zelllinie	40
4.2.1.3	Mykoplasmentest.....	41
4.2.1.4	Vorbereitung der Panc02-Zellen für die orthotope Injektion	41
4.2.1.5	Überlebensfähigkeit der Panc02-Zellen	42
4.2.2	Tierversuche	42
4.2.2.1	Genehmigung	42
4.2.3	In vivo Untersuchungen.....	43
4.2.3.1	Haltung der Mäuse	43
4.2.3.2	Herkunft der CD73 KO Mäuse	43
4.2.3.3	Zucht.....	43
4.2.3.4	Allgemeine Kennzeichnung der Mäuse zur Wiedererkennung.....	44
4.2.3.5	Genotypisierung CD73 KO Mäuse	45
4.2.3.6	Orthotope Injektion der Panc02-Zellen.....	47
4.2.3.7	Beobachtungszeitraum und Tötungskriterien.....	48
4.2.3.8	Tötung und Entnahme der Milz und des Tumors.....	49
4.2.3.9	Entnahme von Blut bei gesunden Mäusen und Herstellung von Serum	49
4.2.4	Ex vivo Untersuchungen	50
4.2.4.1	Herstellung einer Zellsuspension aus Milzen oder Tumoren	50
4.2.4.2	Konservierung der Splenozyten bzw TILs in flüssigem Stickstoff	50
4.2.4.3	Entnahme der Milzen bei gesunden Mäusen.....	50
4.2.4.4	Splenozytenkultur und Behandlung	50
4.2.5	FACS	51
4.2.5.1	Verwendete Panels.....	51
4.2.5.2	Allgemein Erstellung eines Panels	52
4.2.5.3	FACS Kompensation.....	52
4.2.5.4	FACS Antikörpertitration	53

4.2.5.5	FACS extrazelluläre Färbung.....	54
4.2.5.6	FACS intrazelluläre Färbung	54
4.2.5.7	FACS IFN γ	54
4.2.5.8	FACS-Panel TNK	55
4.2.5.9	FACS-Panel B-Zell.....	55
4.2.5.10	FACS-Panel Treg.....	55
4.2.5.11	FACS-Panel DC-MDSC	56
4.2.5.12	FACS-Panel IFN γ	56
4.2.5.13	FACS-Panel CD73	56
4.2.6	Bio-Plex Zytokinmessung aus Serum.....	57
4.2.7	Statistik	57
5	Ergebnisse.....	59
5.1	Etablierung	59
5.1.1	Bestimmung der günstigsten Menge an Antikörper für die FACS-Messungen.....	59
5.1.1.1	TNK-Panel, T _{reg} -Panel und B-Zell-Panel	59
5.1.1.2	DC-MDSC-Panel	61
5.1.1.3	IFN γ -Panel.....	63
5.1.1.4	CD73-Panel	64
5.1.2	Genotypisierung der CD73KO-Nachzucht	65
5.1.3	Überlebensdauer der Panc02 Zellen	66
5.1.4	Panel der Immunophänotypisierung.....	67
5.1.4.1	TNK-Panel	67
5.1.4.2	B-Zell-Panel.....	69
5.1.4.3	T _{reg} -Panel	71
5.1.4.4	DC-MDSC-Panel	72
5.1.5	IFN γ -Panel.....	75
5.1.5.1	Gatingstrategie	75
5.1.5.2	Unstained und FMOs.....	76
5.1.6	Panel der Zytokinbehandlung.....	77
5.1.6.1	Gatingstrategie	78
5.1.6.2	Unstained und FMOs.....	79
5.2	Immunophänotypisierung	79
5.2.1	CD73KO-Mäuse zeigen mehr CD4 ⁺ T _{effector} -Zellen und T _{con} , jedoch weniger aktivierte T _{con} und T _{reg}	79
5.2.1.1	T-Lymphozyten	79

5.2.2	CD73KO-Mäuse zeigen tendenziell mehr B-Lymphozyten.....	85
5.2.3	CD73KO-Mäuse zeigen weniger NK-Zellen und auch weniger aktivierte NK-Zellen	86
5.2.4	CD73KO-Mäuse zeigen weniger pDC, geringere CD86 Aktivierung der pDC und vermehrte CD80 und CD86 Aktivierung der cDC.....	87
5.2.4.1	pDCs inklusive Aktivierung mit CD80 und CD86.....	87
5.2.4.2	cDCs inklusive Aktivierung mit CD80 und CD86	90
5.2.5	CD73KO-Mäuse zeigen keine Veränderungen der Anzahl der MDSC und Makrophagen	93
5.2.5.1	MDSC	93
5.2.5.2	Makrophagen	94
5.2.6	CD73KO-Mäuse zeigen weniger IL-6 im Serum	95
5.3	Tumorimplantation	96
5.3.1	CD73KO-Mäuse bilden weniger und kleinere Tumoren.....	96
5.3.1.1	Tumorbildung nach 30 Tagen.....	97
5.3.1.2	Tumolvolumen nach 30 Tagen.....	97
5.3.2	FACS-Messungen	98
5.3.2.1	Tumortragende CD73KO-Mäuse zeigen weniger T-Lymphozyten in der Milz auf als nicht tumortragende und in Milzen befinden sich generell mehr T-Lymphozyten als in Tumoren	98
5.3.2.2	CD73KO-Mäuse zeigen keine Veränderungen bei den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus den CD45 ⁺ 3 ⁺ Zellen.....	101
5.3.2.3	Tumortragende CD73KO-Mäuse zeigen weniger CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen aus den CD45 ⁺ Zellen in den Milzen als nicht tumortragende und in Milzen sind generell mehr dieser Zellen als in Tumoren	104
5.3.2.4	Die ratios von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ Zellen unterscheiden sich unter den Mäusen und Geweben nicht	108
5.3.2.5	Immunzellen der Milzen und Tumoren lassen sich in ihrer IFN γ -Produktion erfolgreich stimulieren	111
5.3.2.6	CD73KO-Mäuse zeigen auf verschiedenen Ebenen geringeres Basal-IFN γ in Milzen und erhöhtes Basal-IFN γ der CD8 ⁺ T-Zellen in Tumoren	114
5.3.2.7	CD73KO-Mäuse zeigen auf mehreren Ebenen eine höhere ratio von stimuliertem zu unstimuliertem IFN γ in Tumoren	117
5.3.2.8	Tumortragende CD73KO-Mäuse zeigen tendenziell weniger Basal-IFN γ der Leukozyten in Milzen.....	119
5.3.2.9	Stimulierte IFN γ -Werte der Lymphozyten und CD4 ⁺ -T-Zellen aus Milzen korrelieren bei C57BL/6-Mäusen mit dem Tumolvolumen	121
5.3.2.10	Bei CD73KO-Mäusen korrelieren stimulierte IFN γ -Werte aus Tumoren auf fast allen Ebenen mit dem Tumolvolumen.....	124

5.4	Zytokinbehandlung.....	128
5.4.1	In vitro Behandlung von Splenozyten mit IL-13, IL-17, IFN γ und IL-13+TGF β hat keinen erhöhenden Einfluss auf die CD73-Expression.....	128
5.4.1.1	IL-13	128
5.4.1.2	IL-17A.....	130
5.4.1.3	IFN γ	132
5.4.1.4	IL-13+TGF- β	133
5.4.2	VEGF in hohen Konzentrationen lässt die CD73 Expression auf CD4 $^{+}$ -T-Zellen sinken.....	134
5.4.2.1	VEGF	134
5.4.3	Die Expression von CD73 sinkt auf CD8 $^{+}$ -T-Zellen und steigt auf B-Lymphozyten nach zwei Tagen in vitro ohne Behandlung	136
5.4.3.1	d0 vs d2.....	136
6	Diskussion.....	139
7	Zusammenfassung.....	149
8	Summary.....	151
9	Literaturverzeichnis	153
10	Abbildungsverzeichnis	159
11	Tabellenverzeichnis	163
12	Danksagung	165

2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AF700/647	Alexa Flour 700/647
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANF	Atipamezol-Naloxon-Flumazenil
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APC	antigen-presenting cells (Antigenpräsentierende Zellen)
APC-Cy 7	Allophycocyanine-cyanine-7
APCP	α,β-methylene-ADP (CD73 Inhibitor)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BUV496	Brilliant Ultraviolet 496
BV421/510/605/650/711	Brilliant Violet 421/510/605/650/711
bzw.	beziehungsweise

CD	Cluster of differentiation
cDC	conventional DC (konventionelle DC)
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxorubicin
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal-Calve-Serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter
FVS	Fixable Viability Stain

g	Gravität (Zentrifuge)
g	Gramm
IFN γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
KO	knockout
M-MDSC	monozytäre MDSC
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC-I/-II	Major Histocompatibility Complex -I/-II
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMF	Medetomidin-Midazolam-Fentanyl
NaCl	Natriumchlorid
n.e.	nicht ersichtlich
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
Nt5e	ecto-5'-nucleotidase
p	Signifikanzniveau

PCR	polymerase chain reaction
PDAC	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PBS	Phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoid DC (plasmazytäre DC)
PE	phycoerythrin
PE-Cy7	phycoerythrin-cyanine 7
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP-Cy5.5	peridinin chlorophyll protein complex- cyanin 5.5
pg	Pikogramm
PMN-MDSC	Polymorphnukleäre MDSC
PMT-Voltage	Spannung des Photomultipliers
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium nach <i>Roswell Park Memorial Institute</i> benannt
RT	Raumtemperatur (21°C)
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
s.o.	siehe oben
SSC	Side Scatter
stim	stimulierter Zellen
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetate-EDTA-Puffer
T _{con}	konventionelle T-Zellen

TCR	T-cell antigen receptor
T _{effector}	Effektor-T-Zelle
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
T _{memory}	Gedächtnis-T-Zelle
T _{naive}	naïve T-Zelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
unstim	unstimulierte Zellen
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
WBZ	Walther-Brendel-Zentrums
WT-Mäuse	Wildtyp-Mäuse, C57BL/6
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung
α	alpha
β	beta
γ	gamma
7AAD	7-Aminoactinomycin

3 Einleitung

3.1 Das Immunsystem

Da das Thema dieser Dissertation hauptsächlich auf dem immunologischen Geschehen im Körper basiert, wird in dieser Arbeit zunächst das Immunsystem als ein hochkomplexes Abwehrsystem des Körpers gegen sowohl körperfremde als auch körpereigene potentielle und präsente Gefahren und Schäden genauer erläutert. Hierbei denkt man zunächst an Gefahren infektiöser Natur, wie etwa Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, jedoch spannt sich der Wirkungsbereich des Immunsystems deutlich weiter. Nahezu jeder körperfremde Stoff muss vom Immunsystem erkannt und gegebenenfalls eliminiert werden. Doch in unserem Körper spielen sich tagtäglich auch Prozesse ab, bei denen Fehler korrigiert, also entartete Zellen beseitigt werden müssen, bevor sie sich weiter teilen können und neoplastische Strukturen entstehen. Die Mechanismen, durch die das Immunsystem wirkt, kann man verschiedentlich einteilen, beispielsweise nach angeborenem und erworbenem (adaptivem) Immunsystem.

3.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem, oder auch unspezifisches Immunsystem genannt, ist sozusagen die Basisausstattung die ein jedes Individuum von Geburt an besitzt. Die Zellen des Immunsystems erkennen die Pathogene, die sie bekämpfen sollen, nicht durch Antigene, sondern durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), mit Hilfe ihrer Mustererkennungsrezeptoren (PRR). Überwindet ein Mikroorganismus die Schleimhautbarriere, trifft er zunächst auf gewebeständige Makrophagen, die durch Zytokine und Chemokine, weitere Immunzellen des angeborenen Immunsystems aus dem Blut anlocken und so entsteht eine Entzündung. Parallel hierzu wird das Komplementsystem aktiviert, das ihrerseits die Phagozytose der Pathogene zusätzlich begünstigt. Die Hauptaufgabe erledigen hierbei die neutrophilen Granulozyten und die Makrophagen, welche durch einwandernde Monozyten, die sich vor Ort zu weiteren Makrophagen differenzieren, zahlenmäßig ergänzt werden. Diese Vorgänge sind schneller und unspezifischer als die der adaptiven Immunantwort und bilden im Gegensatz zu dieser kein immunologisches Gedächtnis. Erst wenn Pathogene diese angeborene Barriere erfolgreich überwinden, wird in der Regel die adaptive Immunreaktion aktiv [1].

3.1.1.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen myeloiden Ursprungs, die sich aus in der Blutbahn zirkulierenden Monozyten, die ins Gewebe übergetreten sind, differenzieren. Makrophagen sind in erster Linie Phagozyten, die somit in der Lage sind durch PRR wie die Toll-ähnliche Rezeptoren (toll-like receptors, TLR) auf ihrer Oberfläche Pathogene zu erkennen, aufzunehmen und in ihren intrazellulären Vesikeln zu zersetzen. Im weiteren Verlauf von Entzündungen sind sie, ähnlich wie dendritische Zellen (DC), in der Lage den Zellen der erworbenen Immunantwort die Antigene der phagozytierten Pathogene an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren und diese so zu aktivieren [1]. Alle Leukozyten tragen den Oberflächenmarker CD45 und Makrophagen lassen sich durch den Oberflächenmarkern CD11b und F4/80 aus den Ly6-G⁺ Leukozyten identifizieren.

3.1.1.2 Granulozyten

Granulozyten sind Zellen myeloiden Ursprungs und lassen sich nach Anfärbbarkeit ihrer Granula in drei funktionell unterschiedliche Gruppen einteilen.

Die größte und wichtigste Gruppe stellen die neutrophilen Granulozyten dar. Ihre Hauptaufgabe ist, wie oben erwähnt, die Phagozytose von Pathogenen, die wiederum durch TLR erkannt werden. Neutrophile Granulozyten kommen im Gegensatz zu Makrophagen im gesunden Gewebe nicht vor. Sie wandern aktiv aus dem Blut ein, besitzen am Ort der Entzündung nur eine kurze Lebensdauer und ihre abgestorbene Form bildet, neben toten Zellresten, den Hauptbestandteil von Eiter.

Eosinophile und basophile Granulozyten sind in erster Linie an der Bekämpfung parasitärer Eindringlinge und an allergischen Reaktionen beteiligt, wobei die Funktionen der basophilen Granulozyten noch nicht hinreichend erforscht ist. Sie verrichten ihre Arbeit hauptsächlich durch die Sekretion ihrer Granula, die sowohl zytotoxische als auch proinflammatorische Komponenten enthält [1]. Granulozyten lassen sich durch die Oberflächenmarker CD66b, Ly6-C und Ly6-G aus den Leukozyten identifizieren.

3.1.1.3 Mastzellen

Mastzellen sind ebenfalls myeloiden Ursprungs und wandern aktiv in das Gewebe ein. Dort setzen sie ihre Granula frei, was durch das enthaltene Histamin und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) die Entstehung der Entzündung begünstigt. Dies geschieht vor allem im Zusammenhang mit parasitären Erkrankungen und Allergien [1].

3.1.1.4 Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC)

Myeloide Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) sind unreife Vorläuferzellen myeloiden Ursprungs, die die Fähigkeit besitzen die T-Zell Immunantwort zu unterdrücken. Bislang sind zwei Gruppen von MDSC bekannt, die nach ihren Vorläuferzellen und ihrer morphologischen sowie phänotypischen Ähnlichkeit zu bekannten Zellen benannt sind. Polymorphnukleäre MDSC (PMN-MDSC) auch granulozytäre MDSC genannt entstammen den granulozytären Vorläuferzellen der Granulozyten und monozytäre MDSC (M-MDSC) entstammen den monozytären Vorläuferzellen der Makrophagen und DC [2-5]. Unter pathologischen Verhältnissen, wie etwa Entzündungen oder in Tumoren wurde gezeigt, dass diese Zellfraktion sich stark in ihrer Zahl ausdehnt und unter anderem Tumorstadium und Metastasen begünstigt und die Immunantwort gegen Tumoren unterbindet [2, 6, 7]. MDSC lassen sich durch die Oberflächenmarker CD11b, Ly6-C und Ly6-G aus den Leukozyten identifizieren.

3.1.1.5 Dendritische Zellen

Namensgebend für diese Zellen myeloiden Ursprungs ist ihre optische Ähnlichkeit zu Nervenzellen. Dendritische Zellen sind ähnlich wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten zur Phagozytose fähig, gehören jedoch aufgrund ihrer Fähigkeit, die Antigene anschließend den T-Lymphozyten an ihrer Oberfläche zu präsentieren, zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC). Neben der Rolle im angeborenen Immunsystem, exprimieren DCs außerdem auf ihrer Oberfläche die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die neben der Antigenpräsentation essentiell für die Induktion der adaptiven Immunantwort und die Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Helferzellen ist. Diese beiden Rollen lassen die DCs als eine Art Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort fungieren [1]. DC lassen sich durch die Oberflächenmarker CD11b, CD11c und CD45R aus den Leukozyten identifizieren.

3.1.1.6 Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Zellen aus der lymphatischen Zellabstammung. NK-Zellen schütten im Falle ihrer Aktivierung zytotoxische Granula aus, die so zur Apoptose der zu eliminierenden Zelle führt. Auf diese Art und Weise werden NK-Zellen vor allem gegen intrazelluläre Pathogene, wie Viren aktiv, indem sie infizierte Zellen erkennen und töten. Zudem sind sie in der Lage entartete, zum Beispiel Tumorzellen, abzutöten. Sie sind in ihrer Vorgehensweise den zytotoxischen T-Zellen sehr ähnlich, zählen jedoch zur angeborenen

Immunantwort, da sie nicht gegen spezifische Antigene gerichtet, sondern mit unspezifischen Rezeptoren arbeiten, indem sie beispielsweise auf veränderte Glykoproteine auf der Zelloberfläche und/oder auf durch Pathogene veränderte oder fehlende Haupthistokompatibilitätskomplex-1-Moleküle (major histocompatibility complex, MHC I) reagieren. So können sie schneller reagieren und die Immunantwort aufrechterhalten bis zum Einsetzen einer spezifischen T-Zell-Immunantwort [1]. NK-Zellen lassen sich durch den Oberflächenmarker NK1.1 aus den CD3⁺ Leukozyten identifizieren.

3.1.2 Adaptives Immunsystem

Die zuvor erwähnten DC bilden als APC die Grundlage für die Induktion der adaptiven Immunantwort. Sie wandern in periphere lymphatische Organe und präsentieren dort das Antigen über Haupthistokompatibilitätskomplexe 2 (major histocompatibility complex, MHC II) den T-Lymphozyten, die dadurch aktiviert werden. Durch das zusätzliche Expressieren von kostimulatorischen Molekülen und die ausgeschütteten Zytokine werden die T-Lymphozyten angeregt sich endgültig zu differenzieren und die adaptive Immunantwort so voranzutreiben. Bevor dies geschieht, befinden sich die meisten Lymphozyten inaktiv zirkulierend im Körper. Im Grunde bestehen die Zellen des adaptiven Immunsystems aus T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, wobei diese jedoch ein hohes Potential an Differenzierungsmöglichkeiten besitzen und somit in diverse Untergruppen eingeteilt werden [1].

3.1.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind Zellen der lymphatischen Zellabstammung. Ein T-Lymphozyt, der noch nie Antigenkontakt hatte, wird naive T-Zelle (T_{naive}) genannt und jeder einzelne dieser T_{naive} hat unterschiedliche spezifische Antigenrezeptoren gegen nur eine einzige chemische Struktur. Durch die Vielzahl der naiven T-Zellen, wird so eine immense Anzahl von verschiedenen Antigenspezifitäten gebildet. Trifft ein reifer naiver T-Lymphozyt auf ein passendes Antigen und wird so aktiviert, differenziert er sich zur T-Effektor-Zelle ($T_{effector}$) und vermehrt sich. Wurde das Antigen erfolgreich durch die $T_{effector}$ beseitigt, sterben die meisten der ohnehin kurzlebigen spezifischen T-Zellen wieder ab und nur ein kleiner Teil an gleichzeitig entstandenen Gedächtnis-T-Zellen (T_{memory}) bleibt erhalten. So entsteht eine immunologisches Gedächtnis und es kann im Falle eines erneuten Kontakts mit dem gleichen Antigen eine deutlich schnellere adaptive Immunantwort herbeigeführt werden [1]. T-

Lymphozyten lassen sich durch den Oberflächenmarker CD3 aus den Leukozyten identifizieren und durch CD62L und CD44 sowohl bei den T-Helfer- als auch den zytotoxischen T-Zellen in ihre Subpopulationen aufteilen.

3.1.2.1.1 T-Helfer-Zellen

T-Helferzellen tragen den Oberflächenmarker CD4 und werden durch MHC II aktiviert. MHC Moleküle der Klasse 2 befinden sich auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen Makrophagen und DC [1, 8] und präsentieren so Antigenpeptide aus intrazellulären Vesikeln. Dadurch kommt es zur klonalen Expansion der T_{effector} Helferzellen. Hier sind jedoch verschiedene Untergruppen beschrieben, zu denen sich die T_{naive} differenzieren können. Die wichtigsten sind die CD4-T_{H1}-Zellen, die CD4-T_{H2}-Zellen, die CD4-T_{H17}-Zellen und die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Die Hauptfunktion der CD4-T_{H1}-Zellen ist die weitere Aktivierung von Makrophagen und Stimulation von B-Lymphozyten, was wiederum auch die Hauptfunktion der CD4-T_{H2}-Zellen darstellt. CD4-T_{H17}-Zellen haben als Hauptfunktion die weitere Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Ort des Geschehens, sowie die Produktion von großen Mengen neutralisierender Antikörper anzuregen. Die T_{reg} hingegen haben die absolut entgegengesetzte Funktion der Unterdrückung der Immunantwort, um so eine exzessive Immunantwort, die dem Organismus mehr schaden als nutzen würde zu verhindern und Autoimmunitäten zu unterbinden [1]. T_{reg} lassen sich durch den Oberflächenmarker CD25 und den intrazellulären Marker FoxP3 aus den CD4⁺-T-Zellen identifizieren.

3.1.2.1.2 Zytotoxische-T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen tragen den Oberflächenmarker CD8 und werden durch MHC I aktiviert. Diese MHC Klasse 1 Moleküle sind auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen zu finden und präsentieren im Normalfall Peptidfragmente der Proteine, die sie intrazellulär synthetisieren. Im Falle von Infektionen oder Entartungen dienen diese MHC-Moleküle gemeinsam mit ihrem gebundenen Antigenpeptid jedoch den T-Lymphozyten über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) als Erkennungsmerkmal [1, 8]. Die so aktivierten naiven CD8-T-Zellen differenzieren sich anders als die T-Helferzellen nur zu einer Gruppe von T_{effector}, den zytotoxischen CD8-T-Zellen. Ihre Hauptfunktion ist das Abtöten von virusinfizierten Zellen, indem sie die entsprechende Zelle durch Freisetzung ihrer zytotoxischen Granula (Perforin, Granzyme und Granulysin) zur Apoptose anregen [1].

3.1.2.1.3 Natürliche Killer-T-Zellen

Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) sind ebenso Zellen der lymphatischen Zellabstammung und gehören, anders als ihr Name vermuten lässt, nicht zu den NK-Zellen. Ihr Name rührt daher, dass sie zwar T-Lymphozyten sind, jedoch zusätzlich den Oberflächenmarker NK1.1 ausbilden, der sonst nur auf NK-Zellen zu finden ist. Ihre hauptsächliche Funktion ist die rasche Ausschüttung von großen Mengen an Zytokinen zur Aktivierung von T-Zellen. Hierbei sind sie in der Lage das Verhältnis der T_H1 zu T_H2 -Zellen hin zu Gunsten der T_H2 -Zellen zu verschieben [1]. NKT-Zellen lassen sich durch den Oberflächenmarker NK1.1 aus den T-Lymphozyten identifizieren.

3.1.2.2 B-Lymphozyten

Hauptaufgabe der B-Lymphozyten ist die Produktion von Antikörpern. Dies geschieht zum Teil, indem das Antigen über den B-Zell-Rezeptor erkannt und die B-Zelle direkt aktiviert wird, um sich daraufhin zur Plasmazelle zu differenzieren und zu proliferieren. In den meisten Fällen wird jedoch das erkannte Antigen intrazellulär in den B-Zellen zu Peptiden abgebaut, die wiederum wie schon bei den T-Helferzellen beschrieben, per MHC II Molekülen den T-Helferzellen präsentiert werden. Daraufhin sind die T-Helferzellen durch Ausschüttung von Zytokinen in der Lage die B-Zellen zu aktivieren und zur Differenzierung und Proliferation anzuregen. Alle so proliferierten Plasmazellen besitzen dann dieselbe Antigenspezifität und fangen an Antikörper, die Immunglobuline, gegen das Antigen zu bilden. Im Zuge dessen entstehen auch hier B-Zellen mit Gedächtnisfunktion, die bei erneutem Kontakt mit einem identischen Antigen eine schnellere Antikörperproduktion einleiten können [1]. B-Zellen lassen sich durch den Oberflächenmarker CD19 aus den CD3⁺ Leukozyten identifizieren.

3.1.3 Tumormmunologie

Der tagtägliche Kampf des Immunsystems gegen entartete Zellen, von denen jede einzelne theoretisch das Potential hätte, einen Tumor zu bilden, lässt sich in drei Phasen einteilen. In der ersten, der „Eliminationsphase“, ist das Immunsystem erfolgreich in der Lage, entartete potentielle Tumorzellen zu eliminieren. Dies entspricht dem gesunden Zustand. In der zweiten, der „Gleichgewichtsphase“, in der nicht alle Tumorzellen abgetötet werden konnten und diese sich mit dem Immunsystem durch ständige Mutationen die Waage halten, aber nicht unkontrolliert proliferieren können. In der dritten, der

„Entkommensphase“, jedoch ist es den Tumorzellen gelungen dem Immunsystem zu entgleiten und sich nahezu uneingeschränkt zu vermehren [1].

Die Strategien, wie es Tumoren letztendlich schaffen dem Immunsystem zu entkommen sind vielseitig. Entartete Zellen können beispielsweise ihre Immunogenität verringern, indem sie ihre MHC-Moleküle verändern. Wenn so keine Kombination aus Antigenpeptid und MHC-Molekül zustande kommt, können die Zellen auch nicht vom Immunsystem erkannt werden. Eine weitere Möglichkeit des „immune escape“ ist, dass durch natürliche Selektion die Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und abgetötet werden, die ein erkennbares Tumorantigen aufweisen, sich aber Tumorzellen durchsetzen können, die beispielsweise durch Endozytose oder Antigenvariabilität ihr Antigen verloren haben. Zudem gibt es bei Tumorzellen die Fähigkeit, sich ein günstiges Mikromilieu zu schaffen, indem sie eine lokale Immunsuppression auslösen, beispielsweise durch Stimulation von T_{reg} oder Ausschüttung von tumor-growth-factor-beta (TGF-β), oder sogar physikalische Barrieren in Form von Kollagen errichten [1, 9].

Durch diese Tatsachen und das immer besser gewordene Verständnis wie Tumoren das Immunsystem umgehen, wurde die Immunotherapie gegen Tumoren zum vielversprechenden Therapieansatz. Hierbei wurden und werden verschiedenste Ansätze erforscht, die alle zum gemeinsamen Ziel haben, den Tumor durch das körpereigene Immunsystem zu bekämpfen. Sehr vielversprechend und bereits seit längerem erfolgreich im Einsatz ist beispielsweise die humorale Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab gegen CD20 bei B-Zell Lymphomen [10-12] oder der erfolgreiche Einsatz von Ipilimumab bei Melanomen, um CTLA-4 zu blockieren und die T-Zell-Aktivierung zu stimulieren [13, 14].

Die im nächsten Kapitel beschriebene immunsupprimierende Rolle von CD73 hat ebenfalls das Potential Ansatzpunkte für neue Immuntherapien auf dessen Basis zu definieren [15].

3.2 CD73

3.2.1 CD73 und Adenosin im Allgemeinen

CD73, auch bekannt als Ecto-5'-Nukleotidase, ist ein im Körper weit verbreitetes Enzym. Als solches katalysiert es die Hydrolyse von Nukleotiden zu Nukleosiden, im speziellen Adenosinmonophosphat (AMP) zu aktivem Adenosin [1]. Es ist extrazellulär mittels Glycosylphosphatidylinositol-Anker an der Oberfläche der Plasmamembran von Zellen verankert, besteht aus 548 Aminosäuren, hat eine molekulare Masse von 61 kDa und hat seine maximale Enzymaktivität bei einem pH von 7-8 im leicht alkalischen Milieu [16, 17]. Hierbei binden an das N-terminale Ende zwei Metallionen (Zink und Cobalt), von deren Anwesenheit CD73 somit auch abhängig ist und am C-terminalen Ende bindet das AMP [16, 17]. In ähnlicher Form und mit ähnlicher Funktion sind auch 5'-Nukleotidasen im Zellinneren vorhanden, daher trägt CD73 auch den Zusatz „Ecto“ in sich [16].

CD73 wird im humanen peripheren Blut von ca. 11 % der CD4⁺ T-Zellen, 19 % der CD3⁺ Zellen, 51 % der CD8⁺ T-Zellen und 75 % der B-Zellen exprimiert. Bei murinen Immunzellen finden sich vergleichbare Expressionen, jedoch zeigen diese nur sehr wenige B-Zellen mit CD73-Expression und viele der Zellen myeloiden Ursprungs sind im Gegensatz zum Menschen CD73 positiv [18]. Bei den immunregulatorischen Zellen des Immunsystems zeigt sich, dass sowohl T_{reg} [19] als auch MDSC CD73 exprimieren, wobei bei letzteren jene des granulozytären Ursprungs deutlich höhere Mengen exprimieren als jene des monozytären [20].

Als essentieller Baustein der Dephosphorylierung von extrazellulärem AMP zu aktivem Adenosin ist CD73 Teil des Adenosinrezeptorsignalwegs. Der vorherige Schritt dieses Signalwegs wird von CD39 (Ekonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1) bewerkstelligt. Dieses ebenfalls an der Oberfläche der Plasmamembran lokalisierte Enzym hydrolisiert extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und dieses schließlich zu AMP [16, 21]. Sowohl extrazelluläres ATP als auch extrazelluläres Adenosin sind unter physiologischen Umständen in nur relativ geringen Dosen vorhanden, jedoch steigen sie unter ischämischen bzw. hypoxischen und nekrotischen Bedingungen stark an [22-24]. Die erhöhte Konzentration an extrazellulärem ATP wirkt hierbei auf die Zellen des Immunsystems, im speziellen auf Granulozyten, Makrophagen, DC, T- und B-Zellen stark pro-inflammatorisch [23]. Adenosin hingegen hat auf das Immunsystem hauptsächlich eine anti-

inflammatorische Wirkung [25-27]. Den Abbau von ATP zu Adenosin kann man also in diesem Zusammenhang als Gegenregulation zu diesen proinflammatorischen Prozessen sehen, um das betroffene Gewebe vor immunologischen Schäden und Autoimmunreaktionen zu schützen. So versucht sich das ATP-Adenosin-System gegenseitig die Waage zu halten [28].

Mithilfe von Mausexperimenten und in vitro Versuchen konnte der enge Zusammenhang des ATP-CD39-CD73-Adenosin-Komplexes mit zahlreichen Erkrankungen, wie beispielsweise Infektionen, AIDS, Autoimmunerkrankungen, Arteriosklerose, ischämischen Reperfusionsschäden und Tumoren gezeigt werden [29, 30], aber auch protektive Funktionen am vaskulären Endothel wurden nachgewiesen [31].

Durch CD73, das in großen Mengen auf den Zellen des Endothels zu finden ist, wurden außerdem vasodilatatorische Funktionen des Adenosins, die CD73 abhängig sind nachgewiesen [32] und die Aufrechterhaltung der Barriere des Endothels unter hypoxischen Bedingungen zur Verhinderung von überhöhter vaskulärer Permeabilität ist ebenfalls von diesem Adenosinkomplex abhängig [33, 34]. Die Rolle des Adenosins in der Proliferation und Migration von Endothelzellen zeigt zudem dessen Funktion in der Angiogenese, wofür hauptsächlich der von ihm stimulierte vascular endothelial growth factor (VEGF) verantwortlich ist [35-37].

Extrazelluläres Adenosin kann an vier verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden, welche A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 genannt werden und jeweils andere Mechanismen in Gang setzen [38]. Eine wichtige Rolle spielt hier die zahlenmäßige Erhöhung von T_{reg} , sowie deren immunsupprimierender Aktivität über Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors [39, 40], die Hemmung der Proliferation und Zytokinproduktion von $T_{effektor}$ über den A_{2A} -Rezeptor [19, 41], aber auch die Erhöhung der MDSC über den A_{2B} -Rezeptor [42]. Ebenfalls wird die Proliferation von NK-Zellen durch Adenosin blockiert [43] und die VEGF Produktion lässt sich über den A_{2A} -Rezeptor durch Agonisten steigern und durch Antagonisten senken [44] (Abb. 1). Der häufigste auf Immunzellen exprimierte und in dieser Arbeit auch interessanteste dieser Rezeptoren ist der A_{2A} -Rezeptor, da über diesen sowohl die immunsupprimierenden als auch die angiogenetischen Prozesse gesteuert werden [45, 46]. Des Weiteren werden über die Adenosin-Rezeptoren Verschiebungen in der Produktion von Chemokinen und Zytokinen durch die einzelnen Zellen des Immunsystems induziert [47, 48]. $CD4^+$ T-Zellen

beispielsweise zeigen eine deutlich verringerte IFN γ -Ausschüttung durch Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors [49].

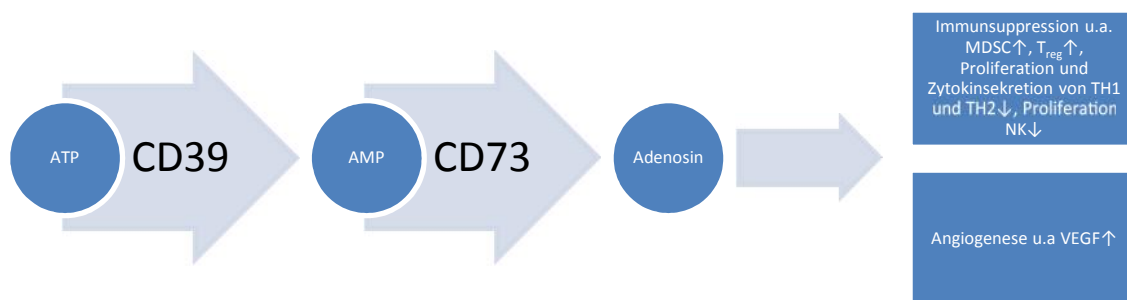


Abbildung 1: Extrazellulärer Abbau von ATP zu aktivem Adenosin und dessen Wirkung[16, 19, 37, 39, 40, 42, 43]

Bei all der Vielfalt an Funktionen dieses Signalwegs, ist in dieser Arbeit aber die immunsupprimierende und tumorbegünstigende Wirkung des CD73-Adenosin-Komplexes im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren und deren Umgehung des Immunsystems, sowie die Möglichkeiten dieses Verständnis in der Bekämpfung von Tumoren einzusetzen, von besonderem Interesse.

3.2.2 CD73 und Tumor

Die allgemeine Funktion von CD73 und die Wirkung des extrazellulären Adenosins auf den Organismus und speziell das Immunsystem ist seit langem Bestandteil der aktuellen Forschung, jedoch zeigt sich immer deutlicher das Potential dieses Signalwegs Tumoren eine günstige Umgebung für ihr unkontrolliertes Wachstum zu schaffen.

CD73 wird auf diversen Tumorzelllinien in unterschiedlichem Maße exprimiert und im Tumorgewebe findet eine Erhöhung der Expression statt [50]. *Jin et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass in vitro Tumor-CD73 die Apoptose von antigenspezifischen T-Zellen fördert und in vivo Tumor-CD73 in der Lage ist die Proliferation von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen zu beeinträchtigen [50].

Blay et al. konnten zeigen, dass die Konzentration von Adenosin direkt in Tumoren, also in der Tumormikroumgebung, 10-20-fach höher ist als in der direkt benachbarten Umgebung des Tumors [51]. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass auch das immunsupprimierende und somit tumorbegünstigende Potential des Adenosins lokal in diesem Bereich dementsprechend höher ausfällt. Ergänzend hierzu zeigt sich, dass Endothelzellen die aus CD73^{+/+}-Mäusen isoliert wurden eine signifikant höhere Proliferationsrate aufweisen als jene aus CD73KO-Mäusen, was einen essentiellen Baustein für die Neovaskularisation darstellt [52]. Dies konnte durch *Wang et al.* weiter bestätigt werden, da durch die Inkubation mit Tumorzellkulturüberstand diese Endothelzellen von CD73KO-Mäusen weniger Ansätze von Röhrengefäßen bilden als die der CD73^{+/+}-Vergleichsgruppe [52]. Diese Effekte konnten *Wang et al.* anhand von Mammakarzinom 4T1-Zellen und Prostatakarzinom RM-1-Zellen in vivo ebenfalls belegen. Das Tumorgewebe von CD73KO-Mäusen zeigte analog zu den in vitro Versuchen auch hier eine geringere Bildung von Röhrenstrukturen und außerdem eine signifikant geringere Anzahl an Kapillaren als bei CD73^{+/+}-Mäusen [52]. Auch durch die spezifische Aktivierung der Adenosinrezeptoren A₁, A_{2A} und A₃ lässt sich eine erhöhte Neovaskularisation und Angiogenese im Tumormodell nachweisen, die zudem durch eine erhöhte Einwanderung von Makrophagen begleitet wird [53].

Die Inkubation von AMP mit Tumorexosomen und anschließende Inkubation des entstandenen Substrats auf T-Zellen in Kultur zeigt eine Attenuierung der T-Zell-Funktion (Hemmung der Proliferation, IL-2- und TNF- α -Produktion). Diese Attenuierung findet sowohl in Gegenwart des CD73 Inhibitors α,β -methylene-ADP (APCP) als auch ohne statt, was die direkte Fähigkeit der Immunsuppression durch Tumorexosome mittels Adenosinproduktion nahelegt [41].

Diverse Studien haben anhand von Lymphknoten aus Leukämiepatienten, Melanom- und Mammakarzinomzelllinien gezeigt, dass CD73 in Tumoren überexprimiert wird [54-56]. Auch die Überexpression aller vier Adenosinrezeptoren auf humanen Tumorzelllinien wurde vielfach gezeigt [57]. Interessanterweise erhöht das Zytostatikum Doxorubicin (DOX) in vitro die CD73-Expression von MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen signifikant und in vivo löst die Überexpression von CD73 auf AT-3 Mammakarzinomzellen eine Chemoresistenz gegen die Behandlung mit DOX aus [58]

Umansky et al. teilen diese Adenosinaktivität in zwei funktionelle Wirkweisen ein. Einerseits die parakrine Wirkung, die sich über CD73, das von T_{reg}, MDSC und Tumorzellen exprimiert wird und so Adenosin produziert, was wiederum die Funktion von T_{effector}-Zellen einschränkt. Andererseits die autokrine Wirkweise, bei der das CD73, das auf tumorinfiltrierenden T_{effector}-Zellen exprimiert wird, Adenosin produziert und so weitere T_{effector}-Zellen in ihrer Funktion beschränkt [59].

Eine Möglichkeit die Effekte des durch CD73 entstehenden Adenosins auf das Immunsystem im Allgemeinen und im Speziellen auf die immunologische Abwehr von Tumoren genauer zu untersuchen stellt der genetische Knockout von CD73 auf zellulärer Ebene oder an Mäusen dar. So können in vitro und in vivo Vergleiche zu Wildtypmäusen gezogen werden.

3.2.3 CD73 Knockout und Inhibition

Durch einen Knockout von CD73 bei Mäusen konnte festgestellt werden, dass CD73KO-Mäuse im physiologischen Zustand zwar gleich große Lymphknoten wie Wildtypmäuse aufweisen, jedoch aktivierte Lymphknoten 24 h nach einem inflammatorischen Stimulus bei den Knockout-Mäusen deutlich größere (1,5-fach) Volumina und eine erhöhte (2,7-fach) Lymphozytenmigration, sowohl von B- als auch T-Lymphozyten, aufweisen [60]. Zudem zeigen CD73KO-Mäuse unter hypoxischen Bedingungen eine deutlich erhöhte Gefäßpermeabilität [34].

In verschiedenen Tumormodellen wurde nachgewiesen, dass ein Fehlen von CD73 das Tumorwachstum behindern kann. Bei in vivo Versuchen wurde gezeigt, dass B16 Melanomzellen geringere Tumorumfänge und ein geringeres Metastasepotential in CD73KO-Mäusen zeigen und mit einer erhöhten intratumoralen IFN γ Menge der CD45⁺ Zellen einhergehen [61]. Bei der Induktion von Fibrosarkomen zeigten sich ebenfalls weniger und kleinere Tumoren bei CD73KO-Mäusen und dieses Resultat konnte durch Antikörper gegen NK-Zellen und IFN γ neutralisiert werden, was die Abhängigkeit dieser verbesserten Tumorabwehr von NK-Zellen und IFN γ verdeutlicht [62]. Ebenfalls in dieser Arbeit konnten *Stagg et al.* im Tumormodel des Prostatakarzinoms sowohl durch einen CD73 Knockout als auch antiCD73 Antikörper ein verlangsamtes Tumorwachstum und eine deutlich geringere Anzahl an Lungenmetastasen zeigen [62]. *Stagg et al.* konnten auch mit den Tumorzelllinien MC38-ova, EG7, AT-3 und B16-F10 deutlich verringerte Wachstumsraten der Primärtumoren im subkutanen (s.c.) Tumormodell zeigen und anhand von MC38-ova und EG7 eine

Abhängigkeit dieser Ergebnisse von CD8⁺-T-Zellen zeigen, da der protektive Effekt des CD73 Knockouts durch antiCD8 Antikörper neutralisiert werden konnte [63]. In soliden B16-SiY und EG7 Tumoren zeigten sich außerdem bei den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) deutlich höhere Mengen an CD8⁺ T-Zellen, nicht jedoch MDSC, NK und CD4⁺ T-Zellen. Auch in den Milzen dieser tumortragenden Mäuse zeigten sich mehr CD8⁺ T-Zellen und zudem mehr IFN γ ⁺CD8⁺ T-Zellen [64]. *Wang et al.* konnten hier ebenfalls zeigen, dass bei CD73KO-Mäusen mehr antigenspezifische Antitumor-T-Zellen in diesen Tumoren vorzufinden sind und außerdem die Antitumoreffekte von T-Zellen, die durch T_{reg} reduziert werden, von der Anwesenheit von CD73 abhängig sind [64]. Die Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen im Zusammenhang mit der Adenosinwirkung in der Bekämpfung von Tumoren geht auch aus den Untersuchungen von *Ohta et al.* hervor, die zeigten, dass die Kombination aus A₂-Rezeptorantagonisten und dem Transfer von Tumorpeptid-spezifischen CD8⁺-Zellen eine Reduktion von Lungenmetastasen bei Mäusen hervorruft [65].

Des Weiteren zeigt sich, dass der Einsatz des selektiven CD73 Blockers APCP bei CD73KO-Mäusen in einer noch effektiveren Immunabwehr des Tumors resultiert [64]. Dies lässt abermals darauf schließen, dass nicht nur die CD73-Expression des Wirtes, sondern auch der Tumorzellen entscheidend für das Tumorstadium ist. Ebenso lassen sich ein geringeres Tumorstadium, verlängerte Überlebensdauer und geringere Metastaseraten auch durch den Einsatz von antiCD73 Antikörpern [66], sowie eine Kombination aus einer Blockade des A_{2A}-Rezeptors und antiCD73 Antikörpern bei Mäusen im Vergleich zur Monotherapie deutlich verbessern [67]. Zu gleichem Ergebnis kamen auch *Vijayan et al.* in einem Tumormetastasenmodell [68]. Die eingangs bereits erwähnte Chemoresistenz gegen DOX bei in vivo Experimenten mit Mammarkarzinomzelllinien, die CD73 überexprimieren, lässt sich ebenso durch die Kombinationstherapie aus DOX und antiCD73 Antikörpern neutralisieren und verlängert so die Überlebensdauer von Mäusen um ca. 50% verglichen mit einer DOX-Monotherapie [58].

Antonioli et al. zeigen anhand einer Tabelle sehr deutlich wie umfangreich die Menge an in vivo Studien zu diesem Thema der Tumorforschung bereits ist und wie durch Agonisten, Antagonisten, Inhibitoren, Antikörper u.a. auf die vier verschiedenen Adenosinrezeptoren, CD39 und CD73 Einfluss genommen wird, mit überwiegend positiven antitumoralen Ergebnissen [69]. Auf vergleichbare Art und Weise zeigen *Allard et al.* tabellarisch

zusammengefasst die zahlreichen Korrelationen aus hoher CD73-Expression und schlechter Prognose bei verschiedensten Tumoren [70].

All diese Effekte der Reduzierung der Adenosinwirkung u.a. durch den Knockout des Enzyms CD73 eröffnen neue Perspektiven in der Immunotherapie von Tumoren jeglicher Art und bieten somit mehr als genug Ansatzpunkte zur genaueren Erforschung der immunologischen Hintergründe dieser verbesserten Tumorabwehr. Diese Meinung teilen etliche Autoren, die sich mit der Zusammenfassung der aktuellen Forschungsergebnisse zu diesem Thema auseinandergesetzt haben [70-82]

3.3 Pankreaskarzinom

3.3.1 Tumorerkrankungen allgemein

Tumorerkrankungen sind ein weitverbreitetes Phänomen unter Säugetieren einschließlich des Menschen. Weltweit haben Menschen mit den Folgen von Tumoren und ihrem oftmals auch tödlichen Ausgang zu leiden und auch in Deutschland haben Tumorerkrankungen mittlerweile den Ruf einer Volkskrankheit. Im Jahr 2014 sind schätzungsweise 249160 Männer und 226960 Frauen an Tumoren erkrankt, wovon 121331 der Männer und 101641 der Frauen an den unmittelbaren Folgen des Tumors verstorben sind. Die relative 5-Jahres Überlebensrate von Menschen die in Deutschland an einem Tumor erkrankt sind beträgt bei Männern 59 % und bei Frauen 65 % [83]. Diese Daten zeichnen ein düsteres Bild, für jene Menschen, die mit der Diagnose „Krebs“ konfrontiert werden. Doch Krebs ist nicht gleich Krebs und somit unterscheiden sich die Prognosen für das Überleben einer Tumorerkrankung innerhalb der verschiedenen Arten des Ursprungsgewebes teils erheblich. Eine der bis heute für den Patienten ungünstigsten Diagnosen unter den Tumoren stellt das pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC) dar.

3.3.2 Das Pankreaskarzinom

Das PDAC rangiert zwar bei Männern mit 3,4 % nach den Tumoren an Prostata, Lunge, Darm, Harnblase, malignes Melanom der Haut, Niere, Magen, Non-Hodgkin-Lymphom und Mundhöhle/Rachen nur auf Platz 10 der häufigsten Tumorneuerkrankungen in Deutschland. Jedoch belegt es mit 6,8 % aller tumorbedingten Sterbefälle nach den Tumoren an Lunge, Prostata und Darm den vierten Platz. Bei Frauen stellt sich ein ähnliches Bild dar. Hier ordnet

sich das PDAC hinter den Tumoren an Brustdrüse, Darm, Lunge, Gebärmutterkörper und dem malignen Melanom der Haut auf Platz 6 der häufigsten Tumorneuerkrankungen ein. Auch hier zeigt sich mit einem prozentualen Anteil von 8,2 % der häufigsten Tumorlokalisationen nach Sterbefällen ein deutlich höherer Rang 4 nach Brustdrüsen-, Lungen- und Darmtumoren [84]. Seit 1980 bis 2004 sind die altersstandardisierten Erkrankungsraten für das Pankreaskarzinom sowohl bei Männern als auch bei Frauen stark angestiegen, wohingegen sich die Überlebensraten in diesen 24 Jahren nur geringfügig besserten [85]. Dieser Trend setzt sich fort und so nahmen auch im Zeitraum zwischen 2003 und 2013 die Neuerkrankungen, wenn auch in geringem Maße, erneut zu [86].

3.3.3 Risikofaktoren PDAC

Als gesicherte Risikofaktoren gelten für die Erkrankung mit dem PDAC, wie für alle Krebsarten generell [83], das Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus und exzessiver Alkoholkonsum [87]. Passend hierzu konnte anhand von Mausstudien gezeigt werden, dass Mäuse die eine Diät mit hohem Fett- und Kalorienanteil gefüttert werden, eher zu Pankreastumoren neigen, als die Kontrollgruppe [88]. Familiäres Risiko (Verwandschaft 1. Grades zu einem Bauchspeicheldrüsenkrebspatienten) sowie chronische Pankreatitis ergänzen die Liste der Risikofaktoren [87]. Bei einer Auswertung von 13131 PDAC-Patienten ergab sich, dass Männer in einem signifikant jüngeren Alter erkranken und zusätzlich zum Zeitpunkt der ersten Feststellung leicht größere Tumoren aufweisen als Frauen. Interessanterweise zeichnete sich bei dieser Auswertung auch ab, dass Menschen mit ethnischer Herkunft aus Afrika signifikant öfter an einem PDAC erkranken, als Menschen aller anderen ethnischen Gruppen [89].

3.3.4 Diagnostik PDAC

Die Möglichkeiten zur Diagnose und genaueren Einordnung welche Art des Pankreaskarzinoms vorliegt sind vielfältig. Zunächst kann mittels Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Radiographie die Lage, Größe und Metastasierung des Tumors bestimmt werden. Zur weiteren Abklärung ob und in welchem Maße eine bösartige Erkrankung des Pankreas vorliegt, wird die Biopsie mit anschließender histologischer Untersuchung angewandt. Zur genaueren Bestimmung der Größe der Neoplasie lassen sich außerdem spezielle Tumormarker, u.a. Carbohydrate Antigen 19-9

(CA19-9), bestimmen, wobei die Detektion neuer und aussagekräftigerer Biomarker vor allem zur Früherkennung Gegenstand aktueller Forschung ist [90-92].

3.3.5 Therapie/Heilungsaussichten PDAC

Das PDAC ordnet sich sowohl mit der mittleren 5-Jahres-Überlebensrate mit 9-10 %, als auch der 10-Jahres-Überlebensrate mit 8 % in Deutschland auf einem der letzten bzw. dem letzten Platz unter allen verglichenen Tumoren ein [84]. Diese Tatsache lässt die therapeutischen Ansätze und die Heilungsaussichten bis heute sehr blass erscheinen. Ausschlaggebend hierfür ist mit Sicherheit die bis heute schlechte Krebsfrüherkennung, da diese Tumorart in frühen Stadien mit entweder sehr wenigen oder allgemein sehr unspezifischen Symptomen einhergeht [93]. Schwäche, Nausea, Vomitus, Inappetenz, Diarrhoe und ein Druckgefühl im Oberbauch, das häufig auch von einem Schmerzgefühl im Rücken begleitet wird, sind nur einige dieser unspezifischen Symptome, die den Betroffenen nicht unmittelbar an eine Tumorerkrankung denken und den Weg zum Arzt zur Abklärung suchen lassen [90, 94]. Im weiteren Verlauf und mit zunehmender Raumforderung des Pankreaskarzinoms sowie dem invasiven Wachstum in direkt benachbartes Gewebe, kann es unter Umständen auch zur Stauung der Gallenflüssigkeit und somit Symptomen einer Erkrankung mit Gallensteinen kommen [90, 94]. Auch die Insulinproduktion kann durch die neoplastischen Veränderungen im Pankreas behindert werden und somit ein dem Diabetes mellitus ähnliches Krankheitsbild entstehen [90, 94]. Nicht zuletzt geht das Pankreaskarzinom im fortgeschrittenen Stadium häufig mit einem starken Gewichtsverlust der betroffenen Patienten einher, was unter Umständen oftmals erst das entscheidende Kriterium für das Aufsuchen eines Arztes darstellt [90, 94].

Die therapeutischen Ansätze variieren je nach Lage und bereits erfolgter Ausbreitung und Metastasierung des Pankreaskarzinoms. Bei der Lage im Pankreaskopf erfolgt in der Regel eine partielle Duodenopankreatektomie nach Whipple, die je nach Streuung noch durch weitere Resektionen von Organteilen, wie etwa Teile des Magens, erweitert wird. Bei anderen Lagen oder lokal weiter fortgeschrittenen Formen, kommen auch totale Resektionen, sowie der Abbruch der Operation und die Einleitung einer rein palliativen Behandlung vor. Als ergänzende Behandlung zur operativen Behandlung oder im Falle eines irresektablen Pankreaskarzinom wird eine adjuvante Chemoradiotherapie, meist mit Gemcitabin oder Kombinationen die dieses enthalten, angewandt [90, 94]. Im Vorfeld wird,

im Falle eines resektablen PDAC, in der Regel eine neoadjuvante Therapie eingesetzt, welche aus Radio- und/oder Chemotherapie bestehen kann und zum Ziel hat ein „tumor down staging“ und bessere Resektionserfolge zu erzielen, wenngleich der Erfolg dieser Therapie bei den verschiedenen Tumorstages kontrovers diskutiert wird [95]. Zudem stellt die Immunotherapie eine ergänzende Möglichkeit dar das PDAC durch Aktivierung des Immunsystems in seinem Wachstum zu hindern, oder dieses auf diesem Wege gar zu eliminieren. Hierbei besteht jedoch das Problem, dass eine Aktivierung des Immunsystems auch in einer Aktivierung dessen immunsupprimierender Anteile, v.a. T_{reg} und MDSC, resultiert und so dem Tumor die Möglichkeit zur Immunevasion liefert [96, 97].

3.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Tatsache, dass das PDAC bis heute einer der am schwersten zu diagnostizierenden und am weitesten verbreiteten Tumoren des Menschen in der heutigen Zeit darstellt und noch dazu in der Regel aufgrund der späten Erkennung sehr schwer therapierbar und mit einer hohen Sterblichkeitsrate einhergeht, macht diese Neoplasie zu einem sehr wichtigen Gegenstand aktueller Forschung. Da die Ausprägung eines Tumors in der Regel immer mit einem Versagen des Immunsystems seinen Ursprung nimmt, beziehungsweise Tumoren auf verschiedenste Art und Weise in der Lage sind sich ein Milieu zu schaffen, dass sie vor diesem schützt, ist es von großem Interesse genau an diesem Punkt anzusetzen.

CD73 bietet durch seine Rolle in der Produktion von extrazellulärem Adenosin, welches wiederum durch immunsupprimierende und angiogenetische Eigenschaften Tumoren in ihrem Wachstum begünstigt, einen vielversprechenden Ansatzpunkt.

Die durchwegs positiven Effekte eines CD73 Knockouts bei Mäusen im Zusammenhang mit der Abwehr von Tumoren wurden in diversen Arbeiten zuvor bereits nachgewiesen. Es scheint als würde ein Knockout dieser Nukleotidase Tumoren das Wachstum und das Entkommen vor dem Immunsystem erschweren.

An gesunden Mäusen mit einem genetischen Knockout dieses Enzyms soll deshalb in dieser Arbeit eine umfangreiche Immunophänotypisierung erstellt werden, um so im Vergleich zu gesunden Wildtypmäusen eventuelle zelluläre und humorale Unterschiede zu identifizieren,

die Auskunft darüber geben können, weshalb es zu dieser verbesserten Abwehr von Tumoren kommt.

Im Weiteren soll durch eine orthotope Injektion von Pankreastumorzellen und der anschließenden Messung der IFN γ -Produktion der Immunzellen in Milzen und Tumoren die immunologische Aktivität der beiden Mausgruppen verglichen werden, um die Hypothese zu stützen, dass eine erhöhte immunologische Aktivität für die Abwehr der Tumoren verantwortlich ist.

Da sich außerdem in noch unveröffentlichten Studien zeigte, dass die Inkubation mit Zellkulturüberstand einer Pankreastumorzelllinie die CD73-Expression von Splenozyten in Kultur erhöhen kann, soll zuletzt eine in vitro Behandlung von Splenozyten mit den im Überstand enthaltenen Zytokinen Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Maße diese für die vermehrte Expression des CD73 verantwortlich sind.

4 Material & Methoden

4.1 Material

4.1.1 Durchflusszytometrie (FACS)-Antikörper und Färbungen

Kanal	Hersteller	Produkt -Nr.	Bezeichnung	Klon	Inhalt	Konzentrati on	Iso
BV421	BD Pharmingen	564198	CD86Brilliant Violet™ 421	GL1	50 µg	0,2 mg/ml	Rat (LOU) IgG2a, K
BV650	BD Pharmingen	563687	CD80Brilliant Violet™ 650	16- 10A1	50 µg	0,2 mg/ml	Armenian Hamster IgG2, K
PE	BD Pharmingen	560592	Ly-6CPE	AL-21	100µg	0,2 mg/ml	Rat IgM, κ
BUV 496	BD Pharmingen	564662	CD45R/B220BU V496	RA3- 6B2	50 µg	0,2 mg/ml	Rat IgG _{2a} , κ
Alexa 700	BD Pharmingen	560583	CD11c Alexa Fluor®700	HL3	50 µg	0,2 mg/ml	Armenian Hamster IgG ₁ , λ2
BV510	BD Pharmingen	562950	CD11bBrilliant Violet™ 510	M1/70	50 µg	0,2 mg/ml	Rat DA, also known as DA/HA IgG _{2b} , κ
PerCP	BD Pharmingen	560602	Ly-6GPerCP- Cy5.5	1A8	50 µg	0,2 mg/ml	Rat LEW, also known as Lewis IgG _{2a} , κ
BV711	BD Pharmingen	565612	F4/80Brilliant Violet™ 711	T45- 2342	50 µg	0,2 mg/ml	Rat Wl, also known as Wistar (outbred) IgG _{2a} , κ
BV450	BD Pharmingen	560468	CD4 V450	RM4.5	100µg	0,2mg/ml	Rat (DA) IgG2a, K
FITC	BD Pharmingen	553079	FITC Rat Anti- Mouse CD45	30-F11	100µg	0.5 mg/ml	Rat (LOU) IgG2b, κ
FITC	BD Pharmingen	553061	CD3eFITC	145- 2C11	100µg	0,5 mg/ml	Armenian Hamster IgG1, K
APC	BD Pharmingen	560401	FoxP3 Alexa Flour 647	MF23	100µg	0,2 mg/ml	Rat IgG2b
PE	BD Pharmingen	553165	NK-1.1PE	PK136	200µg	0,2 mg/ml	Mouse (C3H x Balb/c) IgG2a, K
PerCP	BD Pharmingen	560513	CD62L PerCP Cy5.5	MEL- 14	50 µg	0,2 mg/ml	Rat (F344) IgG2a, K
BV510	BD Pharmingen	563068	CD8aBrilliant Violet™ 510	53-6.7	50 µg	0,2 mg/ml	Rat OFA, also known

							as Outbred OFA IgG ₁ , λ
BV605	BD Pharmingen	563061	CD25Brilliant Violet™ 605	PC61	50 µg	0,2 mg/ml	Rat OFA, also known as Outbred OFA IgG ₁ , λ
BV711	BD Pharmingen	740664	BD OptiBuild™CD69 BV711	H1.2F3	50 µg	0,2 mg/ml	Armenian Hamster IgG ₁ , λ3
BV650	BD Pharmingen	740455	BD OptiBuild™CD44 BV650	IM7	50 µg	0,2 mg/ml	Rat IgG _{2b} , κ
APC- Cy7	BD Pharmingen	552051	APC-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD4	GK1.5	100µg	0.2 mg/ml	Rat (LEW) IgG _{2b} , κ
APC- Cy7	BD Pharmingen	557659	CD45 APC-Cy7	30-F11	100µg	0,2 mg/ml	Rat LOU, also known as Louvain, LOU/C, LOU/M IgG _{2b} , κ
Alexa Fluor 647	BD Pharmingen	557869	Alexa Fluor® 647 Rat Anti- Mouse CD3 Molecular Complex	17A2	100µg	0.2 mg/ml	Rat (SD) IgG _{2b} , κ
Alexa Fluor 700	BD Pharmingen	557959	Alexa Fluor® 700 Rat Anti- Mouse CD8a	53-6.7	100µg	0.2 mg/ml	Rat (LOU) IgG _{2a} , κ
Alexa Fluor 700	BD Pharmingen	557958	CD19Alexa Fluor® 700	1D3	100µg	0,2 mg/ml	Rat LEW, also known as Lewis IgG _{2a} , κ
PE	BD Pharmingen	554412	PE Rat Anti- Mouse IFN-γ	XMG1. 2	100µg	0.2mg/ml	Rat IgG ₁ , κ
PE	BD Pharmingen	550741	CD73 PE	TY/23	100µg	0,2mg/ml	Rat (WI) IgG _{2a} , κ
PE-Cy7	BD Pharmingen	560516	CD62L PE-Cy7	MEL- 14	50 µg	0,2mg/ml	Rat (F344) IgG _{2a} , κ
PerCP	Biolegend	420404	7-AAD Viability Staining Solution	---	500 tests = 2,5 ml	0,05mg/ml	---

Tabelle 1: FACS-Antikörper

4.1.2 FACS-Kompensations-Beads und Stimulationspräparate

Hersteller	Produktnummer	Bezeichnung	Inhaltsstoffe
BD Biosciences	552845	BD CompBeads Anti- Rat and Anti-Hamster Ig k /Negative Control Compensation	Anti-Rat/Hamster Ig k Compensation Particles and Negative Control (FBS)

		Particles Set	Compensation Particles
BD Biosciences	552843	BD CompBeads Anti-Mouse Ig k /Negative Control Compensation Particles Set	Anti-Mouse Ig k Compensation Particles and Negative Control Compensation Particles
BD Biosciences	554724	Protein Transport Inhibitor	Monensin solution
BD Biosciences	550583	Leucocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug	phorbol ester, PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), a calcium ionophore (Ionomycin) and the protein transport inhibitor BD GolgiPlug™ (Brefeldin A)

Tabelle 2: FACS-Kompensation-Beads und Stimulationspräparate

4.1.3 Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Sterilbank murin Linie	Hera Safe	Thermo Scientific
Sterilbank murin Primär	Hera Safe	Thermo Scientific
Zentrifuge murine	centrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge FACS 1	Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge FACS 2	Rotina 48 R	Hettich Zentrifugen
Minizentrifuge Proteinlabor	centrifuge 5417 R	Eppendorf
Mikroskop murin 1	Laborlux S	Leitz
Mikroskop murin 2	ID 03	Zeiss
Kühlschrank FACS links	Labo	Kirsch
Kühlschrank FACS rechts	profiline	Liebherr
Kühlschrank murin	profiline	Liebherr
Gefrierschrank FACS 1, -20	Premium	Liebherr
Gefrierschrank FACS 2, -20	Arctis 132	AEG
Gefrierschrank, -80	VIP series -86°C	Sanyo
Stickstofftonne FACS	Kryobehälter, Arpege 75	Air Liquide Medical GmbH
Accujet murin 1	accu-jet pro	Brand
Accujet murin 2	easypet	Eppendorf
Accujet FACS 1	accu-jet pro	Eppendorf
Accujet FACS 2	accu-jet pro	Eppendorf
Pipetten 100-1000, 10-100, 2-20 µl	Eppendorf Reference® 2	Eppendorf
Pipetten 100-1000, 10-100, 2-20 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf
Pipetten 100-1000, 10-100, 2-20 µl	Transferpette®, Typ Variabel	Brandt
Multistepper FACS	Multipipette plus	Eppendorf
Vortex FACS 1	VX 100	Labnet

Vortex FACS 2	K-550-GE	Bender & Hobein AG
Vortex murin	Vortex Genie 2	Scientific Industries
FACS	Fortessa	BD
Warmwasserbad	WNB basic	memmert
Inkubator murin oben	Modell C 170	Binder
Inkubator murin unten	Modell C 170	Binder
Autoklav	Unisteri	MMM Group
Bio-Plex	luminex 100	BioRad
Feinwaage	FX-40	AND Electronic Balance
Waage	JL1502-G	Mettler Toledo
Gelkammer horizontal	Modell 40-1214	PexLab Biotechnologie GmbH
Mikrowelle	n.e.	Siemens
Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Mastercycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf
Microzentrifuge	MINI CENTRIFUGE 12V	sprout
Gelanalysegerät	ChemiDoc™ MP Imaging System	BioRad
Gelanalysegerät	UV-Transilluminator	LTF Labortechnik
Gefriercontainer	Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific

Tabelle 3: Laborgeräte

4.1.4 Lösungen und Flüssigkeiten

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)	PAN Biotech	P04-36500
RPMI 1640	gibco	21875-034
RPMI 1640	Lonza Biowhittaker	BE12-702F
Trypsin EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Lonza Biowhittaker	BE17-161E
Fetal Calve Serum (FCS)	Biochrom AG	S 0115
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma	P4458-100ML
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva	20385
Millipore	Abteilung Anästhesiologie	
Gigasept	Schülke	10629
Erythrolysepuffer:		
Ammoniumchlorid 8,3g/L	FLUKA	9711
Kaliumhydrogencarbonat 1,0g/L	FLUKA	60340
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 0,0372 g/L	Sigma	E6511-100G
FACS-Puffer:		
DPBS 1L	s.o.	
Natriumacid 10% 2ml	Morphisto	1.355.300.100
BSA 5g	biomol	1.400.100
Permeabilization Buffer 10x	eBioscience	00-8333-56

IC Fixation Buffer	eBioscience	00-8222-49
Nährmedium:		
RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Pen/Strep		s.o.
Freezemedium:		
90% FCS + 10% DMSO		s.o.
FACS:		
FACSClean	BD	340345
FACSRinse	BD	340346
Millipore		s.o.
Polymerase Chain Reaction (PCR):		
Agarose	PeqLab Biotechnologie GmbH	732-2789
TAE-Puffer (50x)	Serva	42549
RNaseZAP	Sigma	R2020-250ML
RNase free Water	Qiagen	129112

Tabelle 4: Lösungen und Flüssigkeiten

4.1.5 OP-Material

Name	Bezeichnung lt. Hersteller	Hersteller	Artikelnummer
Rasierer	AESCULAP Schermaschine Exacta	Braun	GT-415
Leukoplast	Leukopor	BSN Medical	1698801
Desinfektionsspray	Poly-Alcohol Haut	Antiseptica	UN1219
Kanülen gelb	Microlance 3 30G	BD	304000
Kanülen braun	Microlance 3 27G	BD	303800
Kopfhaube	Bouffant	Medline	FS63350
Gesichtsmaske	Medical Face Mask	Barrier	4236
Tupfer	Gazin 7,5x7,5cm	LR	13621
Heizplatte	Thermolux	Witte + Sutor	463265
Spritze 1ml	Plastipak 1ml	BD	303172
Klammerapparat	Reflex 7 Clip Applier	CellPoint Scientific	204-1000
sterile Klammern	Reflex 7 Clips	CellPoint Scientific	203-1000
Klammerentferner	Reflex Clip Remover	CellPoint Scientific	205-1000
Nahtmaterial 4-0 absorbierbar	Vicryl Plus 4-0	Ethicon	VCP292H
Nahtmaterial 5-0 absorbierbar	Prolene 5-0	Ethicon	8710H
steriles Abdecktuch	Secu-Drape	Sengewald	538823
Saugkissen	MoliNea Plus	Hartmann	161600
Microliterspritze	Microliter Syringe	Hamilton	80408
anatomische Pinzette		n.e.	
chirurgische Pinzette		n.e.	
Ösenpinzette		n.e.	
Schere vorne stumpf		n.e.	

Nadelhalter	n.e.
Schere	n.e.
Pinzette	n.e.
Schieblehre	n.e.
Box für Eis	n.e.
Eis	Spülküche Raum

Tabelle 5: OP-Material

4.1.6 PCR

Hersteller	Produkt-Nr.	Bezeichnung
Bioline	Bio-21126	MyTaq™ Extract-PCR Kit
Bioline	BIO-41025	Agarose
Invitrogen	10787-018	1 Kb Plus DNA Ladder
Eurofins Genomics	H144 37-2181-3/6	Nt5ecommon
Eurofins Genomics	H144 37-2181-2/6	Nt5eWTfor
Eurofins Genomics	H144 37-2181-1/6	Nt5eMutfor
Invitrogen	S33102	SYBR™ Safe DNA Gel Stain

Tabelle 6: PCR-Reagenzien

4.1.7 Pharmaka

Typ	Herstell er	Bezeichnung lt. Hersteller	Wirkstoff	Konzentrati on	Produktnummer
Anästhetika:					
Medetomidin	Orion Pharma	Domitor Injektionslösung	Medetomidinhydrochlorid	1mg/ml	134810-3
Midazolam	B. Braun	Midazolam B.Braun Injektions-/Infusions-/Rektallösung	Midazolamhydrochlorid	5mg/ml	753/13555628/0612
Fentanyl	B. Braun	Fentanyl	Fentanyl als Fentanylcitrat	0,05mg/ml	PZN 06900644
Antagonisten:					
Atipamezol	Orion Pharma	Antisedan	Atipamezolhydrochlorid	5mg/ml	134793-3
Flumazenil	Hexal AG	Flumazenil HEXAL Injektionslösung	Flumazenil	0,1mg/ml	PZN4470955
Naloxon	ratiopharm GmbH	Naloxon-ratiopharm Injektionslösung	Naloxonhydrochlorid	0,4mg/ml	N68761.03
Analgetika:					
Novalgin	ratiopharm GmbH	Novaminsulfon-ratiopharm Injektionslösung	Metamizol-Natrium 1H2O	0,5g/ml	PZN-06882768
Rimadyl	Zoetis Deutsch	Rimadyl Injektionslösung für	Carprofen	50mg/ml	1706155

	land GmbH	Hunde und Katzen			
Verdünnung:					
NaCl	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Isotonische Kochsalzlösung	Natriumchlorid	0,90%	B300854/00
Augensalbe:					
	Bayer Vital GmbH	Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol	5%	81552983

Tabelle 7: Pharmaka

4.1.8 Verbrauchsmaterial

Name	Bezeichnung lt. Hersteller	Hersteller
Mikroreaktionsgefäß 1,5ml	Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäß 2ml	Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäß 0,5ml	Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Kryovile	CryoTube Vials	nunc
Stripette 2,5,10,25,50ml	serological pipet	costar
Pipettenspitzen grau,gelb,blau	epT.I.P.S. Standard	Eppendorf
6-Well,12-Well,96-Well	Nunclon Delta Surface	Thermo Scientific
Zellkulturflasche T75	Nunc Easy Flask 75	Thermo Scientific
Zellkulturflasche T175	Nunc Easy Flask 175	Thermo Scientific
Zellschaber	Zellschaber M	TPP
FACS-Röhrchen	5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Falcon
Falcon 15ml	Zentrifugenröhrchen 15	TPP
Falcon 50ml	50ml Polypropylene Conical Tube	Falcon
FACS-Röhrchen-Ständer	n.e.	
Falcon 50ml+15ml-Ständer	n.e.	
Kryovial-Ständer	n.e.	
Mikroreaktionsgefäß-Ständer	n.e.	
Zellsieb 100µm	Cell Strainer 100 µm Nylon	Falcon
Zellsieb 40µm	cell Strainer 40 µm Nylon	Falcon
Spritze 3ml	Plastipak 3 ml	BD
Handschuhe	Eco Nitrile PF 250 XL	ecoSHIELD
Multistepperaufsatz 100µl	Combitips plus 5 ml	Eppendorf
Multistepperaufsatz 1ml	Combitips plus 50 ml	Eppendorf
PCR-Streifen	Quali-PCR-Tubes	Kisker Biotech
PCR-Streifen Deckel	Quali-PCR-Caps	Kisker Biotech

Tabelle 8: Verbrauchsmaterial

4.1.9 Zytokine

Name	Hersteller	Produkt-Nr.	Bezeichnung	Ursprung	Inhalt	Konz.
IL-13	R&D Systems	413-ML-005	Recombinant Mouse IL-13	E. coli derived, Ser26Phe131, Accession # P20109	5µg	Reconstitute at 50 µg/mL in sterile PBS containing at least 0.1% human or bovine serum albumin
IL-17A	R&D Systems	421-ML-025	Recombinant Mouse IL-17 Protein	<i>E. coli</i> derived Thr22Ala158 Accession # Q62386.1	25µg	Reconstitute at 25 µg/mL in sterile 4 mM HCl containing at least 0.1% human or bovine serum albumin
IFNγ	R&D Systems	485-MI-100	Recombinant Mouse IFN-gamma Protein	E. coli-derived His23-Cys155, with an N-terminal Met	100µg	Reconstitute at 100 µg/mL in sterile PBS containing at least 0.1% human or bovine serum albumin
TGFβ	PeproTech	100-21	Recombinant Human TGF- β 1	HEK293 cells	10µg	Reconstitute in 10mM Citric Acid, pH 3.0 to 0,1-1,0 mg/ml
VEGF	R&D Systems	493-MV-005	Recombinant Mouse VEGF 164	Spodoptera frugiperda, Sf 21 (baculovirus)-derived, Ala27-Arg190	5µg	Reconstitute at 50 µg/mL in sterile PBS containing at least 0.1% human or bovine serum albumin

Tabelle 9: Zytokine

4.1.10 Bio-Plex

Produktbezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IL-1b	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5002M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IL-2	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5003M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IL-6	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5007M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IL-10	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5009M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IL-13	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5012M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IL-17	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5013M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine TNF- α	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5023M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IFN γ	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G5017M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine VEGF	Bio-Rad Laboratories GmbH	171G6008M
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 1 Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH	171I50001
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 2 Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH	171I60001
Bio-Plex Pro Reagent Kit 5 Flat Plate	Bio-Rad Laboratories GmbH	12002798

Tabelle 10: Bio-Plex Reagenzien

4.1.11 Software

Software	Hersteller
MS Office Paket 2010	Microsoft Corporation
GraphPad Prism 5, 6 und 7	GraphPad Software, Inc.
FACSDIVA V8.01	BD Biosciences
Endnote X7.4 und X9	Thomson Reuters
Bio-Plex Manager Software, Standard Edition	Bio-Rad Laboratories GmbH

Tabelle 11: Software

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Erstellen der Zellkultur der Panc02-Zelllinie

Die Zelllinie Panc02 wurde aus der Stickstoff-Zelllinienbank in einem Kryovial, welches 5×10^6 Zellen in einem Milliliter (ml) Freezemedium enthält, entnommen. Das Kryovial wurde bei 37 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) im Wasserbad geschwenkt, bis nur noch ein circa $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ Zentimeter (cm) großer Rest Eis zu sehen war. Die folgenden Schritte, sowie das Passagieren der Zellen geschahen stets unter keimreduzierten Bedingungen in einer Laminar Flow, nach 20 minütiger Warmlaufzeit und Wischdesinfektion aller Geräte und Flaschen. Anschließend wurde der Inhalt des Kryovials in ein 50 ml Falcon gegossen, das 15 ml Nährmedium enthielt und mehrmals mit einer 1000 Mikroliter (μl) fassenden Pipette resuspendiert und Vortexmischer durchmengt. Der gesamte Inhalt wurde anschließend in eine Zellkulturflasche mit 75 Quadratzentimeter (cm^2) Bodenfläche überführt und über Nacht in den Inkubator bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO_2) gestellt. Nach 24 Stunden erfolgte, nach Kontrolle auf Adhäsion eines Großteils der Zellen, ein Wechsel des Nährmediums.

4.2.1.2 Passagieren der Panc02-Zelllinie

Um die Zellen der Linie Panc02 für die orthotope Injektion vorzubereiten und auch außerhalb der OP-Zeiten ein gutes Wachstum zu garantieren, wurden die Zellen zweimal pro Woche, also im Abstand von drei bis vier Tagen je nach Konfluenz der Zellen- als optimal erwiesen sich 90-100%- gesplittet. Hierzu wurde mit einer 25 ml Stripette das Nährmedium abgesaugt und verworfen. Hierfür wurden ca. 5 ml Gigasept in eine leere Plastikflasche gegeben, die fortan als Abfall für jegliche Flüssigkeiten diente. Im Anschluss daran wurde die Zellkulturflasche mit 10 ml sterilem DPBS mehrmals gespült und anschließend ebenfalls verworfen. Dies diente einerseits dazu, nahezu tote und bereits tote Zellen abzuwaschen und andererseits um Reste des Nährmediums zu entfernen, da dieses die Wirkung des im nächsten Schritt verwendeten Trypsin-EDTA beeinträchtigen kann. 5 ml Trypsin-EDTA wurden zum Ablösen in die Zellkulturflasche gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Zur optimalen Entfaltung der Wirkung des Trypsins wurde die Flasche zur Inkubation drei bis maximal fünf Minuten (min) in den Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 gestellt. Für den Fall, dass nach fünf Minuten Inkubation immer noch Zellen leicht adhären waren, konnten

diese durch leichtes Klopfen gegen den Seitenrand der Zellkulturflasche gelöst werden. Die Trypsinreaktion wurde anschließend mit 10 ml Nährmedium gestoppt und der gesamte Inhalt von nun circa 15 ml aus der Zellkulturflasche abgesaugt und in ein 50 ml Falcon überführt. Dieses wurde nun bei 500g, Raumtemperatur (RT), 5 min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Zellpellet wurde durch leichtes Klopfen gegen den Boden des Falcons gelöst und mit 2 ml Nährmedium verdünnt und 3 Sekunden Vortexmischer durchmengt. Anschließend wurde noch mit der 1000 µl Pipette resuspendiert, da die Tumorzellen zu Clusterbildung neigten und ohne diesen Schritt zu fokalem, überwucherndem Wachstum tendierten. Eine neue Zellkulturflasche wurde mit 15 ml Nährmedium befüllt und mit der 1000 µl Pipette wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ein Zehntel, Fünfteil oder Zwanzigstel der Zellsuspension aus dem Falcon in die neue Zellkulturflasche überführt. Direkt nach dem Auftauen war ein 1:10 Splitten nötig, da das Wachstum noch nicht optimal war und mit steigendem Alter konnte Schrittweise zu 1:15 bzw. 1:20 übergegangen werden. Nach behutsamen Schwenken und Kontrolle unter dem Lichtmikroskop, ob sich tatsächlich Zellen in der Flasche befinden, wurden die Zellen in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gegeben. Zur Vorbereitung einer Operation wurde aufgrund der benötigten höheren Zellmenge zwei Wochen vor dem geplanten OP-Termin in eine Zellkulturflasche mit 175 cm² gewechselt. Hierbei waren beim Passagieren alle Arbeitsschritte identisch, es wurden jedoch im Unterschied zur kleineren Flasche 25 ml Nährmedium, und 10 ml Trypsin verwendet.

4.2.1.3 Mykoplasmentest

Um zu garantieren, dass die Zellen in Kultur frei von Mykoplasmen sind, wurde 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und 4 min bei 4°C mit 950g zentrifugiert. 100 µl des Überstand wurden daraufhin in neues Mikroreaktionsgefäß überführt und 5 min bei 96°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei -20°C für eine gesammelte Messung aller Proben des Labors mittels Polymerase-chain-reaction (PCR).

4.2.1.4 Vorbereitung der Panc02-Zellen für die orthotope Injektion

Die Zellen wurden nach dem gleichen Verfahren, wie beim Passagieren abgelöst und pelletiert, jedoch wurde das Pellet anschließend in 2 ml sterilem DPBS resuspendiert. Hiervon wurden ca. 50 µl mittels Pipette in eine 96-Well-Platte mit flachem Boden überführt.

In einem weiteren Well wurden 95 µl Trypan-Blau pipettiert und mit 5 µl, also 1:20 vermischt und wiederholt zur gleichmäßigen Anfärbung aller Zellen resuspendiert. 10 µl der gefärbten Zellen wurden daraufhin in eine Neubauer Improved Zählkammer pipettiert und bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Die benötigte Menge Zellen für die orthotope Injektion betrug 1×10^5 in 5 µl DPBS ($= 2 \times 10^7/\text{ml}$). Also wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit der errechneten Menge sterilem DPBS auf $2 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt. Die Zellen wurden anschließend in ein Kryovial gegeben, da sich Eppendorftubes oder ähnliche Behältnisse für die bei der OP verwendete Hamilton Microliterspritze als zu schmal erwiesen. Das Kryovial wurde für die OP auf Eis gestellt.

4.2.1.5 Überlebensfähigkeit der Panc02-Zellen

Zur Ermittlung der Vitalität der Panc02-Zelllinie in Korrelation zur Zeit wurden die Zellen analog zur Vorbereitung auf eine OP abgelöst, die Konzentration eingestellt und auf Eis gelagert. Zum Zeitpunkt direkt nach der Ablösung, sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und per Lichtmikroskop die lebenden im Verhältnis zu den toten Zellen gezählt. Simultan zu jeder Zählung wurden 20 µl Zellsuspension (4×10^5 Zellen) in einem FACS-Tube in 300 µl FACS-Puffer gelöst und 5 min bei RT im Dunkeln mit dem Lebendtotfarbstoff 7AAD inkubiert. Anschließend wurden diese am Durchflusszytometer auf dem Kanal PerCp gemessen. Um exakte OP-Bedingungen nachzuempfinden, wurde die Zellsuspension zwischen den Messungen im Abstand von 20 min sowohl geöffnet als auch resuspendiert, da diese Zeitspanne in etwa der OP-Dauer einer Maus entsprach. Abschließend wurden 20 µl Zellsuspension in 300 µl 80% Ethanol gelöst und 15 min inkubiert um als Positivkontrolle alle Zellen zu töten und anschließend wie oben beschrieben mit 7AAD angefärbt und gemessen.

4.2.2 Tierversuche

4.2.2.1 Genehmigung

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Eingriffe an lebenden Mäusen wurden von der Regierung von Oberbayern im Tierversuchsantrag Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.0-3-2015, Ausbildung: Chirurgische Tumorzellimplantation genehmigt.

4.2.3 In vivo Untersuchungen

4.2.3.1 Haltung der Mäuse

Die Haltung der Mäuse erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum (WBZ) für experimentelle Medizin, Marchioninstraße 27, 81377 München, den erforderlichen (FELASA erweitert) Hygienebedingungen entsprechend. Hierzu war der Zugang zum Tierstall streng limitiert, es herrschte ein abfallender Druckgradient und vor Betreten des eigentlichen Tierstalls musste in einer Schleuse saubere Dienstkleidung (Überschuhe, Kittel, Haarnetz und Handschuhe) angelegt werden. Die Mäuse wurden gewichtsabhängig in Gruppenhaltung in Standard Makrolon Käfigen mit ad libitum Zugang zu Trinkwasserflaschen und Futter eingestallt. Bei dem Futter handelte es sich um ein standardisiertes, pelletiertes Alleinfuttermittel für Mäuse. Die Raumtemperatur lag bei 22+-2°C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 55+-5% und es erfolgte ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. In den Käfigen dienten standardisierte, staubarme Weichholzfasern als Einstreu und als Enrichment kam zertifiziertes grobes Einstreu (Abbed Nestbaumaterial NGB E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm + NBU E-014, Faserbreite 120 mm) zum Einsatz. Zusätzlich wurden zertifizierte, autoklavierbare Spieltunnel und Nagerhölzer, weiche weiße Cellulose in Form von Labortüchern (Henry Schein) und Zellstofftupfer (4-5 cm) in den Käfigen ergänzt. Die sich in der Zucht befindlichen CD73KO-Mäuse bekamen außerdem noch weitere Maushäuschen und Maustunnel aus zertifiziertem, rotem Kunststoff hinzugefügt. Einmal pro Woche erfolgte durch das Haltungspersonal des WBZ ein Käfig- und Flaschenwechsel, mit vollständiger Erneuerung des gesamten Enrichments.

4.2.3.2 Herkunft der CD73 KO Mäuse

Die Mäuse der CD73KO-Linie wurden als bereits bestehende Zucht übernommen. Ursprünglich wurden die ersten Mäuse dieser Linie bei der Firma „The Jackson Laboratory“ erworben. Der Name des Stamms lautet B6.129S1-Nt5e^{tm1Lft}/J, die Artikelnummer 018986 und die ursprünglichen Zuchtpartner entstammten der Generation N14+N1F0 (26-NOV-12). Der Knockout (KO) wurde erreicht, indem das Exon 3 des ecto-5'-nucleotidase-Gens (Nt5e) ersetzt wurde.

4.2.3.3 Zucht

Da sich bei Übernahme der Mauszucht eine erhöhte Aggressivität der CD73KO-Mäuse feststellen lies, lag die Vermutung nahe, dass die Mäuse äußerst sensibel auf Verpaarungen

zu nah verwandter Elterntiere reagierten. Infolgedessen wurde mit Hilfe der Stammbäume genauestens darauf geachtet, dass die in Verpaarung gesetzten Mäuse stets nicht enger verwandt waren, als Cousins und Cousinen 2ten Grades.

4.2.3.4 Allgemeine Kennzeichnung der Mäuse zur Wiedererkennung

Die C57BL/6 Mäuse wurden stets ohne Ohrmarkierungen geliefert und wurden zur eindeutigen Identifikation im Laufe des ca. vierwöchigen Versuchs im Rückenbereich rasiert. Von den je 3 Mäusen pro Käfig wurde immer eine Maus unrasiert belassen, eine Maus cranial im Nackenbereich und eine Maus caudal im Bereich des Schwanzansatzes rasiert.

Die CD73KO-Mäuse wurden mit 6-8 Wochen vom Personal der Tierzucht Abteilung des Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung des Universitätsklinikums Großhadern (ZNP) mit Ohrstanzen nach folgendem Muster (Abb. 2), entsprechend ihrer einmaligen Nummer im System TierBase, markiert:

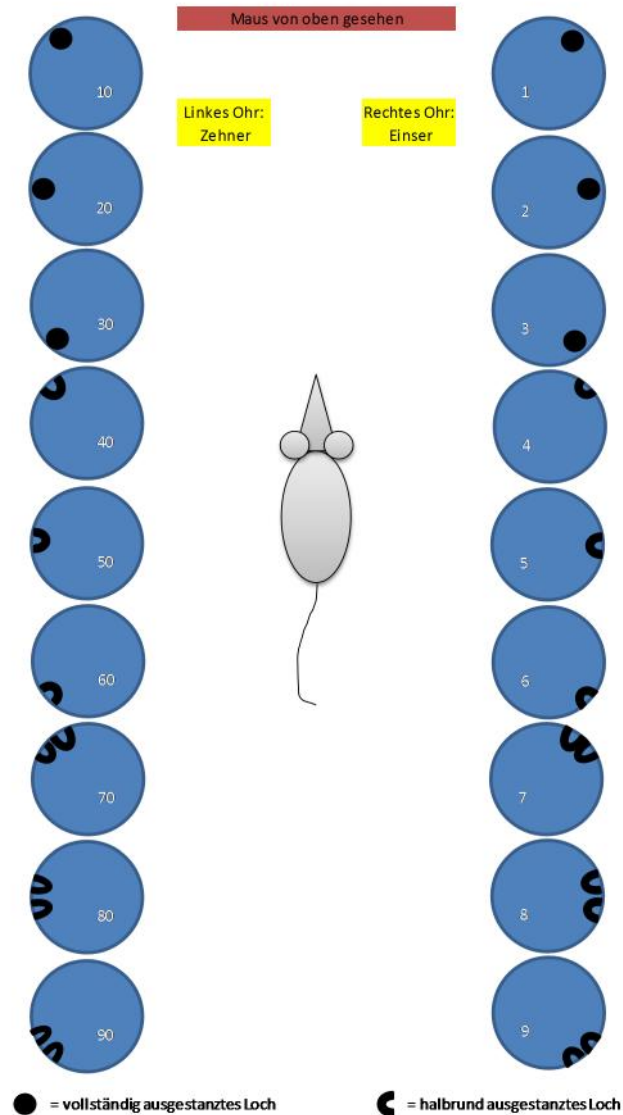


Abbildung 2: Ohrmarkierung CD73KO-Mäuse

4.2.3.5 Genotypisierung CD73 KO Mäuse

Die von jeder neugeborenen Maus der CD73KO-Linie bei der Kennzeichnung gewonnenen Ohrstanzproben dienten außerdem dazu, die Nachkommen mittels PCR zu genotypisieren. So war eine eindeutige Zuordnung zu den Typen Wildtyp-, heterozygote- oder homozygote KO-Maus möglich. Für alle OPs wurden stets reine KO-Mäuse verwendet. Zur Genotypisierung wurde in jedes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß einer jeden Mausohrbiopsie ein Mastermix bestehend aus 20 µl Puffer A, 10µl Puffer B (Bestandteil des MyTaq™ Extract-PCR Kit) und 70 µl destilliertem Wasser hinzugefügt. Die jeweiligen Mikroreaktionsgefäße wurden anschließend zum Verdau der Biopsien in einem Thermoblock bei 75°C und 1000 rpm über Nacht behandelt. Am Folgetag wurden die Puffer bei 95°C und 1000 rpm für 10

min inaktiviert und die Mikroreaktionsgefäße für 1 min bei 12000 rpm in der Minizentrifuge zentrifugiert und der Überstand in neue Mikroreaktionsgefäße überführt. Vom Überstand wurde zweimal je 1 µl in einen PCR-Streifen für die Behandlung mit 24 µl Mastermix des Wildtype-Primers und 24 µl Mastermix des Mutanten-Primers gegeben.

Zusammensetzung:

10x Mastermix WT PCR (für 1 sample)	
12,5 µl	MyTaq HS Red Mix, 2x
0,5 µl	Primer WT (1:10)
0,5 µl	Primer Common (1:10)
10,5 µl	H ₂ O

Tabelle 12: Mastermix Wildtyp

10x Mastermix MUT PCR (für 1 sample)	
12,5 µl	MyTaq HS Red Mix, 2x
0,5 µl	Primer MUT (1:10)
0,5 µl	Primer Common (1:10)
10,5 µl	H ₂ O

Tabelle 13: Mastermix Mutant

Zusätzlich wurde zu jeder PCR eine Negativkontrolle einer Maus, die definitiv Typ Wildtyp war, eine Positivkontrolle einer Maus die definitiv KO-Mutant war, sowie eine Probe die lediglich je 1 µl destilliertes Wasser enthielt, bearbeitet.

Alle Proben wurden daraufhin gleichermaßen bei folgenden Einstellungen im Mastercycler inkubiert (Tab. 14):

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 s	35
Annealing	58 °C	15 s	
Extension	72 °C	20 s	
Melting	72 °C	10 min	

Tabelle 14: Einstellungen Mastercycler

Zur Herstellung des Gels wurde ein 1,5% Agarosegel hergestellt, indem 1,5 g Agarose mit 100 ml TAE Puffer in einem Glaskolben in der Mikrowelle bis zur Blasenbildung erhitzt wurde, sodass die Agarose vollständig in Lösung gegangen ist und zusätzlich wurden 10 µl SYBR® Safe DNA Gel-Stain zur Visualisierung der DNA hinzugefügt. Dieses flüssige Gel wurde anschließend in eine Gelkammer gegossen, mit einem Kamm bestückt, um Taschen zu bilden und zum Aushärten 60 min bei RT ruhen gelassen. In den entstandenen Taschen wurden je 10 µl einer jeden Ohrbiopsieprobe hinein pipettiert und eine weitere Tasche mit 6µl DNA

ladder (Bandbreite 100 bp – 15000 bp) befüllt, um die Größe ablesen zu können. Ein Ladepuffer war nicht nötig, da dieser bereits in dem MyTaq HS Red Mix enthalten war. Die Gelkammer wurde abschließend mit einer Laufzeit von 40 min bei 120 Volt und 200 Milliampere betrieben. Zur Auswertung wurde entweder ein UV-Transilluminator oder ein Gelanalysegerät verwendet. Die Bandenbildung bei Wildtypmäusen sollte bei ca 235 bp erfolgen und die der Mutantenmäuse bei ca 350 bp.

4.2.3.6 Orthotope Injektion der Panc02-Zellen

Für die orthotope Injektion wurden C57BL/6 Mäuse von Charles River und CD73KO-Mäuse aus eigener Zucht im ZNP verwendet. Alle verwendeten Mäuse waren zum Zeitpunkt der OP zwischen 8 und 20 Wochen alt. Eine Woche vor der OP wurden die Mäuse der C57BL/6 Mäuse bestellt und im Tierstall des Walther-Brendel-Zentrums des Universitätsklinikums Großhadern eingestallt, sodass sie sich stressfrei an die neue Umgebung gewöhnen konnten. Die CD73KO-Mäuse wurden ebenfalls eine Woche vor der OP vom WBZ in das ZNP umgestallt. Die Mäuse wurden in der Regel zu je 3 Tieren in einem Käfig gehalten. Für die OP wurden die Mäuse in den Kleintier-OP-Raum verbracht. Unter den OP-Bereich wurde eine elektrische Wärmeplatte platziert und mit einem Saugtuch und einem sterilen OP-Tuch abgedeckt und fixiert. Zur Fixation der Mäuse wurden vier je 4 cm lange Leukoporstreifen für die Gliedmaßen vorbereitet. Die Mäuse wurden per Nackengriff leicht kopfüber gehalten und intraperitoneal (i.p.) mit Midazolam-Medetomidin-Fentanyl (MMF) anästhesiert. Durch druckhaftes Kneifen in die Zehenregion einer Gliedmaße und Ausbleiben einer Reaktion, wurde die Anästhesietiefe kontrolliert. Anschließend wurde Augensalbe aufgetragen, 1,5µl/g Maus Novalgin (1:10) appliziert und der gesamte Abdominalbereich mit einem elektronischen Rasierer von Haaren befreit. Die Maus wurde dann mit den vorbereiteten Leukoporstreifen in Rückenlage fixiert und die Haut im OP-Bereich mit Desinfektionsmittel desinfiziert. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde die Haut circa 3 mm caudal des Xyphoids durch einen 10-15 mm langen Schnitt mit der Schere eröffnet und anschließend die Haut durch stumpfe Präparation mittels Aufspreizen der Schere von der Bauchdecke gelöst. Ebenfalls 3 mm caudal des Xyphoids wurde auf der Linea alba ein 1 cm langer Schnitt mit der Schere angesetzt um das Abdomen zu eröffnen. Die Bauchdecke wurde mit der Pinzette leicht angehoben und dorsal des caudalen Leberlappens wurde mit einer Ösenpinzette der Magen mit dem Duodenum und dem darauf liegenden Pankreas extraperitonealisiert. Die auf Eis liegende Zellsuspension wurde durch behutsames

Schwenken und Klopfen wieder durchmengt und mit der Microliterspritze 5 µl davon aufgezogen. Der Magen wurde erneut mit der Ösenpinzette im Bereich eines Pankreasschenkels fixiert und durch einen flachen Einstich mit nahezu 180° Winkel wurden die Panc02-Zellen in den Pankreaskopf injiziert. Bei korrekter Durchführung ließ sich eine Blasenbildung erkennen. Die Fixation des Magens wurde dann noch für weitere 10 Sekunden unverändert beibehalten, sodass die Zellen sich gleichmäßig verteilen konnten und eine Leckage in den Peritonealraum verhindert werden konnte. Daraufhin wurde der Magen und damit das Pankreas wieder in das Abdomen zurückverlagert. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte mittels einfacher fortlaufender Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial der Größe 5-0. Die Hautnaht erfolgte je nach Größe des Schnittes mit 4-5 Einzelheften im Abstand von 2-3 mm mit absorbierbarem Nahtmaterial der Größe 4-0. Zuletzt wurden noch 2 Hautklammern gleichmäßig über die Naht verteilt, die hauptsächlich als Nageschutz dienten. Als postoperative Analgesie wurden jeder Maus noch 50 µl Rimadyl s.c. (1:50) und als Antagonistenmischung für die verwendete Anästhesie 8,5 µl/g Maus Atipamezol-Naloxon-Flumazenil (ANF) s.c. appliziert. Bis zum Erwachen der Mäuse wurden diese auf der Wärmeplatte vor Hypothermie geschützt und anschließend wieder in ihren Käfig verbracht. Die 3 darauffolgenden Tage wurde täglich zweimal 50 µl/Maus Rimadyl s.c. in den Nackenbereich appliziert und die OP-Wunde bzw. –Naht kontrolliert. Nach Ablauf dieser 3 Tage wurden die Mäuse zweimal pro Woche auf Allgemeinbefinden, Habitus und äußere Verletzungen kontrolliert.

4.2.3.7 Beobachtungszeitraum und Tötungskriterien

Der Beobachtungszeitraum betrug stets 30 Tage ab dem Tag der Operation, wobei die Mäuse einmal wöchentlich gewogen wurden, um ein vermindertes Größenwachstum oder eine tumorbedingte Kachexie festzustellen und auf Verhalten und äußeres Erscheinungsbild hin kontrolliert wurden. Zusätzlich wurden die Mäuse hierbei abdominal palpiert. Als absolute Tötungskriterien wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Symptome entsprechend des Tierversuchsantrags gewertet.

absolute Tötungskriterien
Aszites
Ikterus
schlechtes Allgemeinbefinden (struppiges Fell, Unterkühlung, Verweigerung der Nahrungsaufnahme)
motorische Auffälligkeiten
abnormale Körperhaltung
starke Gewichtsabnahme (>20% im Vergleich zum KGW bei Versuchsbeginn unter Berücksichtigung der Zunahme durch Tumorwachstum)

Tabelle 15: Tötungskriterien

4.2.3.8 Tötung und Entnahme der Milz und des Tumors

Sobald sich das PDAC bei der abdominalen Palpation größer als 1,5 cm zeigte oder andere Tötungskriterien auftraten, wurden die Mäuse mittels cervikaler Dislokation getötet. Auf eine Styroporplatte wurde ein steriles OP-Tuch vorbereitet und fixiert, sowie vier Kanülen gesteckt. Die tote Maus wurde in Rückenlage mit den Kanülen an den Gliedmaßen unter mäßiger Spannung fixiert. Analog zur Injektion der Tumoren wurde das Abdomen eröffnet und mittels einer sterilen Schieblehre wurden der Primärtumor, sowie eventuelle Metastasen in 3 Dimensionen (Länge, Breite, Höhe) vermessen. Die Milz, sowie, falls vorhanden, der Primärtumor im Pankreas wurden schließlich mit einer separaten sterilen Pinzette und Schere entnommen und in ein 50 ml Falcon mit 10 ml sterilem DPBS auf Eis gegeben. Die Mäuse wurden anschließend fachgerecht entsorgt.

4.2.3.9 Entnahme von Blut bei gesunden Mäusen und Herstellung von Serum

Zur Herstellung von Serum für die Zytokinmessung mittels Bio-Plex wurden bei den gesunden C57BL/6 und CD73KO-Mäusen im Zuge der Entnahme der Milz zur Immunophänotypisierung Mengen von 0,2 - 0,6 ml Blut in ein 1,5 ml Serumröhrchen entnommen. Das Serumröhrchen wurde bei RT 30 min bis zur Koagulation ruhen gelassen und schließlich zur Gewinnung des Serums bei 2000g und 15°C für 15 min zentrifugiert. Das Supernatant bzw. Serum wurde mit einer Pipette in eine Eppendorftube überführt und bei -20°C bis zur Zytokinbestimmung mittels Bio-Plex gelagert.

4.2.4 Ex vivo Untersuchungen

4.2.4.1 Herstellung einer Zellsuspension aus Milzen oder Tumoren

Ein 100 µm Zellsieb wurde auf einem 50 ml Falcon platziert und das eisgekühlte DPBS mit der entnommenen Milz wurde hineingegossen. Das Zellsieb mit der Milz wurde auf ein neues 50 ml Falcon gegeben und mit der Rückseite einer 2 ml Spritze durch das Sieb gerieben bis keinerlei grobe Stücke mehr zu sehen waren. Anschließend wurde das Zellsieb mit 10-15 ml sterilem DPBS gespült. Der Inhalt wurde dann bei 400g und RT 5 min zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Darauf wurden 3-5 ml Erythrolysepuffer gegeben, im Vortexmischer durchgemengt und 2 min inkubiert. Mit 10 ml sterilem DPBS wurde die Erythrolyse daraufhin gestoppt und noch einmal durch ein 40 µm Zellsieb gegossen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 400 g RT für 5min wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 10 ml sterilem DPBS zur Zählung (1:10 mit Trypanblau in Neubauer Improved) resuspendiert und anschließend in Freezemedium eingefroren. Die Herstellung einer Zellsuspension aus einem Primärtumor wurde analog durchgeführt.

4.2.4.2 Konservierung der Splenozyten bzw TILs in flüssigem Stickstoff

Zur langfristigen Konservierung der Splenozyten bzw. der TILs wurden diese nach der Herstellung der Zellsuspension gezählt und anschließend in Freezemedium auf 1×10^7 /ml eingestellt. Davon wurde je 1 ml in je ein Kryovial pipettiert und in einem Gefriercontainer zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

4.2.4.3 Entnahme der Milzen bei gesunden Mäusen

Die Entnahme der Milzen bei gesunden Mäusen zur Immunophänotypisierung erfolgte analog zu der Entnahme der Milzen bei tumortragenden Mäusen.

4.2.4.4 Splenozytenkultur und Behandlung

4.2.4.4.1 C57BL/6 Splenozyten

Für die Behandlung der murinen Splenozyten mit Zytokinen wurde aus Milzen von 8-12 Wochen alten, gesunden C57BL/6 Mäusen eine Zellsuspension hergestellt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Diese wurden wie oben beschrieben aufgetaut und in 10 ml steriles Nährmedium gegeben. Nach einer 60 minütigen Äquilibration im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ wurden diese wie oben beschrieben (1:1) gezählt, bei 500g RT für 5min zentrifugiert und mit Nährmedium auf 2×10^6 /ml eigestellt. Von dieser Lösung wurden in eine 12-Well-Platte jeweils 1 ml pro Well pipettiert.

4.2.4.4.2 Behandlung von C57BL/6 Splenozyten mit IL-13/IL-17A/IFN γ /TGF β /VEGF für die Messung der CD73-Expression

Zur Behandlung wurden die in einer 12-Well-Platte befindlichen Splenozyten mit den Zytokinen in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Jeweils an Tag 0 und 1 wurde die definierte Menge Zytokin (Tab. 16) hinzugegeben. Zur Untersuchung einer Veränderung der CD73-Expression wurde an Tag 0 simultan zur Kultivierung der Splenozyten eine FACS-Messung mit diesen mittels des „CD73-Panel“ durchgeführt. Nach der zweitägigen Behandlung sind circa 50% der Splenozyten am Boden der 12-Well-Platte adherent gewesen. Um alle Zellen zu gewinnen, wurde also zunächst das Nährmedium mit den schwimmenden Zellen mit einer 1000 μ l-Pipette in ein 50 ml Falcon überführt. Danach wurde 1 ml steriles DPBS in das Well gegeben und mit einem Zellschaber vorsichtig am Boden des Wells entlang geschabt. Anschließend wurden die so gelösten Splenozyten ebenfalls in das 50 ml Falcon überführt und der Erfolg des Abschabens unter dem Lichtmikroskop überprüft. Die so gewonnenen behandelten Splenozyten wurden anschließend mittels des „CD73-Panel“ am FACS gemessen.

Zytokin	eingesetzte Menge pro Well pro ml			
IL-13	1ng	5ng	10ng	50ng
IL-17A	10pg	100pg	1ng	10ng
IFN γ	10pg	100pg	1ng	10ng
TGF β	10ng in Kombination mit 50ng IL-13			
VEGF	10pg	100pg	1ng	10ng

Tabelle 16: Zytokinkonzentrationen

4.2.5 FACS

4.2.5.1 Verwendete Panels

Es wurden für die Messungen am Durchflusszytometer sechs verschiedene FACS-Panel geplant. Für die Detektion von T-Zell-Subpopulationen (naive, effector, memory) auf Ebene der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen wurde das im folgenden genannte „TNK-Panel“ erstellt.

Für die Detektion von T_{reg}, T_{con} und aktivierten T_{con} wurde das im Folgenden genannte „T_{reg}-Panel“ erstellt.

Für die Detektion von B-Lymphozyten wurde das im Folgenden genannte „B-Zell-Panel“ erstellt.

Für die Detektion von MDSC, Makrophagen, cDC und pDC wurde das im Folgenden genannte „DC-MDSC-Panel“ erstellt.

Für die Detektion von intrazellulär produziertem IFN γ wurde das im Folgenden genannte „IFN γ -Panel“ erstellt.

Für die Detektion der CD73 Expression wurde das im Folgenden genannte „CD73-Panel“ erstellt.

4.2.5.2 Allgemein Erstellung eines Panels

Für die Erstellung eines jeden Panels wurde zuvor geplant, welche Farben sich eigneten, um simultan in einer FMO Kontrolle (Flourescence Minus One) Verwendung zu finden. Dadurch wurde sowohl der Arbeitsaufwand als auch der Verbrauch an Antikörpern minimiert. Bei einer FMO Kontrolle werden alle Antikörper wie herkömmlich eingesetzt, jedoch einer bzw. eine Kombination aus passenden Antikörpern weggelassen, um in gemessenen Proben, bei denen sich die negative schlecht oder gar nicht von der positiven Population trennen lässt, ein sauberes Gate setzen zu können. Bei der Kombination von verschiedenen Antikörpern in einer FMO Kontrolle wurde stets beachtet, dass die Antikörper nicht mit Flouorchromen gekoppelt waren, die auf einer Laserfarbe (Violette, Blue, Yellow-Green und Red) lagen. Außerdem durften die kombinierten Antikörper nicht direkt oder indirekt beim Gating voneinander abhängig sein. CD45 und CD3 benötigten so zum Beispiel stets eine eigene FMO, da jedes weitere Gating aus diesen Populationen entstammt.

4.2.5.3 FACS Kompensation

Die Kompensation stellt bei der Messung an einem FACS einen essentiellen Punkt dar, um saubere Populationen bei einer Messung mit vielen sich überlappenden Farben zu erhalten. Hierbei wird durch das Gerät die Schnittmenge der beiden Populationen rechnerisch korrigiert. Für die Kompensation wurde je ein FACS-tube mit je einem verwendeten Flouorchromnamen beschriftet und zusätzlich ein FACS-tube mit „unstained“ beschriftet. Nun wurde in jedes der Tubes 100 μ l FACS-Puffer pipettiert. Es war wichtig zu beachten, dass man bei den verwendeten Beads die jeweils passende Tierart des Herstellers beachtete; Rat+Armenian Hamster oder Mouse, die in der Lage sind ein jedes Immunglobulin dieser

Spezies zu binden. In jedes der Tubes wurde je ein Tropfen Beads und ein Tropfen Negativkontrolle gegeben. Anschließend wurde die vom Hersteller empfohlene Menge Antikörper in das jeweils beschriftete Tube gegeben. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern betrug dies 5 µl. Nach dem Durchmengen im Vortexmischer und einer Inkubation von 15-30 min bei RT in der Dunkelkammer wurden 500 µl FACS-Puffer hinzugefügt und erneut im Vortexmischer durchgemengt. Bei der eigentlichen Kompensation am BD Fortessa waren zudem ungefärbte Zellen nötig. Diese wurden aufgesteckt, gemessen und die Spannung des Photomultipliers (PMT-Voltage) des side und forward scatters (SSC und FSC) so eingestellt, dass die Zellen im Dotplot deutlich sicht- und abgrenzbar waren. Anschließend wurde die PMT-Voltage bei den einzelnen Flouorchromen so verändert, dass der Peak jeweils knapp unter 10^2 lag. Nun wurde das Tube mit den ungefärbten Beads aufgesteckt und der SSC-Kanal so angepasst, dass diese im Dotplot zu sehen waren. Das Gate P1 wurde daraufhin auf die Population geschoben und dieses Gate auf alle Compensation Controls übertragen. Nach Kontrolle ob alle Peaks der jeweiligen Flouochrome zwischen 10^3 und 10^5 lagen, konnten die Kompensationstubes gemessen und die Kompensation berechnet werden.

4.2.5.4 FACS Antikörpertitration

Um bei einem mehrfarbigen FACS-Panel die ideale Menge Antikörper festzulegen, sodass zu geringe Mengen aber auch Überstrahlungen vermieden werden, wurde jeder einzelne Antikörper auf den verwendeten Zellen titriert. Hierzu wurden stets 500.000 murine Splenozyten mit verschiedenen Konzentrationen bzw. Mengen eines jeden verwendeten Antikörpers gefärbt und anschließend der stain Index ermittelt. Dieser ergibt sich indem man die mean fluorescence intensity (MFI) der negativen Population von der MFI der positiven Population subtrahiert und die Differenz anschließend durch die mit dem Faktor zwei potenzierte Standardabweichung dividiert ($MFI_{positiv} - MFI_{negativ} / 2 \times SD$) [98]. Jene Konzentration mit dem höchsten stain Index in der Titration stand somit für die günstigste Menge an verwendetem Antikörper.

Anfangs wurden je Antikörper ausgehend von der Herstellerempfehlung von 5 µl je drei verschiedene Konzentrationen, 5 µl, 2 µl und 1 µl, titriert. Ergab sich bei 1 µl der beste Färbeindex, so wurde eine weitere Titration mit 1 µl, 1:1 verdünnt und 1:3 verdünnt durchgeführt.

4.2.5.5 FACS extrazelluläre Färbung

Für die extrazelluläre Färbung wurden die zu messenden Zellen in einer Konzentration von minimum 5×10^4 bis maximal 1×10^6 in 100 μ l FACS-Puffer in FACS-tubes gegeben. Anschließend wurden die in dem jeweiligen Panel angegebenen Antikörper bzw. Antikörperversdünnungen mit je 1 μ l hinzugegeben, im Vortexmischer durchgemengt und 15-30 min bei RT in einer Dunkelkammer inkubiert. Danach wurden pro Tube 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben, im Vortexmischer durchgemengt und bei 500 g RT für 5 min zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurden 300 μ l FACS-Puffer ergänzt und erneut im Vortexmischer durchgemengt. Die nun zur Messung bereiten Zellen konnten sofort oder bei 4 °C aufbewahrt bis zu 6 Stunden später am FACS gemessen werden.

4.2.5.6 FACS intrazelluläre Färbung

Bei der intrazellulären Färbung wurde nach der Inkubation der extrazellulären Antikörper und Zentrifugation pro Tube 100 μ l Fixationspuffer hinzugefügt und im Vortexmischer durchgemengt, um diese Antikörper irreversibel zu binden. Diesen Puffer konnte man wahlweise 20 min bei RT inkubieren oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde, um die Zellmembran porös werden zu lassen 2 ml Permeabilisierungspuffer hinzugegeben, im Vortexmischer durchgemengt und bei 500g RT für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt um ein Eindringen der intrazellulären Antikörper sicher zu gewährleisten. Anschließend wurden nach Verwurf des Überstandes die intrazellulären Antikörper laut Panel hinzu pipettiert und 30-60 min bei RT in der Dunkelkammer inkubiert. Um die nicht gebundenen intrazellulären Antikörper wieder auszuwaschen wurden erneut 2 ml Permeabilisierungspuffer pro Tube hinzugegeben, im Vortexmischer durchgemengt und bei 500 g RT für 5min zentrifugiert um die Zellmembran erneut porös werden zu lassen. Danach wurden zur Auswaschung pro Tube 2 ml FACS-Puffer hinzugefügt, wie im vorherigen Schritt zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Letztlich wurden zur Messung analog zur extrazellulären Färbung 300 μ l FACS-Puffer hinzugefügt und innerhalb von 6 Stunden (bei 4°C) gemessen.

4.2.5.7 FACS IFN γ

Zur Stimulation der IFN γ -Produktion wurden gefrorene Splenozyten oder TILs, die aus den Mäusen am Ende des orthotope Injektionsversuchs gewonnen wurden, in 10 ml Nährmedium aufgetaut und gezählt. Anschließend wurden die Proben auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml Nährmedium in einem 50 ml Falcon eingestellt. Für diesen

Versuch wurden unstimulierte Proben mit 4 µl Golgistop (Monensin) pro 6x10⁶/6ml Nährmedium als Proteintransportinhibitor behandelt, um eine Sezernierung des IFN γ zu unterbinden. Stimulierte Proben wurden mit 2 µl Leukozytenaktivierungscocktail (BLK) pro 1x10⁶/1ml Nährmedium behandelt. Beide Ansätze wurden zur Inkubation 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit leicht geöffnetem Falcondeckel in einem Inkubator gelagert. Im Anschluss an die Inkubation wurde wie oben beschrieben extra- und intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

4.2.5.8 FACS-Panel TNK

		Vio B	Vio C	Vio E	Vio F	Blue A	Blue B	Ygr E	Red A
	TNK Panel	BV711	BV650	BV510	V450	PerCP Cy5.5	FITC	PE	APC-Cy7
1	unstained	--	--	--	--	--	--	--	--
2	FMO 1	69	44	8	4	62L	3	NK1.1	--
3	FMO 2	69	44	8	4	62L	--	NK1.1	45
4	FMO 3	69	44	8	--	62L	3	--	45
5	FMO 4	69	44	8	4	--	3	NK1.1	45
6	FMO 5	--	44	8	4	62L	3	NK1.1	45
7	FMO 6	69	--	8	4	62L	3	NK1.1	45
8	sample	69	44	8	4	62L	3	NK1.1	45

Tabelle 17: TNK-Panel

4.2.5.9 FACS-Panel B-Zell

		Blue B	Red B	Red C
	B-Zell-Panel	FITC	AF700	AF647
1	unstained	--	--	--
2	FMO 1	--	19	3
3	FMO 2	45	--	3
4	FMO 3	45	19	--
5	Sample	45	19	3

Tabelle 18: B-Zell-Panel

4.2.5.10 FACS-Panel Treg

		Vio D	Vio F	Blue B	Red A	Red C
	T _{reg} -Panel	BV605	V450	FITC	APC-Cy7	AF647
1	unstained CD73 #176	--	--	--	--	--
2	FMO 1	--	4	3	45	FoxP3*
3	FMO 2	25	4	3	45	--
4	sample	25	4	3	45	FoxP3*

Tabelle 19: T_{reg}-Panel

4.2.5.11 FACS-Panel DC-MDSC

		UV A	Vio B	Vio C	Vio E	Vio F	Blue A	Ygr E	Red B	Red A
	DC-MDSC-Panel	BUV 496	BV711	BV650	BV510	BV421	PerCP Cy5.5	PE	AF700	APC-Cy7
1	unstained	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	FMO 1	CD45R	F4/80	CD80	CD11b	CD86	Ly6-G	Ly6-C	CD11c	--
3	FMO 2	CD45R	--	CD80	CD11b	CD86	Ly6-G	--	--	45
4	FMO 3	--	F4/80	CD80	--	CD86	Ly6-G	Ly6-C	CD11c	45
5	FMO4	CD45R	F4/80	--	CD11b	CD86	--	Ly6-C	CD11c	45
6	FMO5	CD45R	F4/80	CD80	CD11b	--	Ly6-G	Ly6-C	CD11c	45
7	sample	CD45R	F4/80	CD80	CD11b	CD86	Ly6-G	Ly6-C	CD11c	45

Tabelle 20: DC-MDSC-Panel

4.2.5.12 FACS-Panel IFN γ

		Blue B	Red A	Red B	Red C	Ygr E	
	IFN γ Panel	FITC	APC Cy7	AF700	AF647	PE	
1	unstained	--	--	--	--	--	unstimuliert
2	FMO 1	--	4	8	3	IFN γ	
3	FMO 2	45	--	8	3	IFN γ	
4	FMO 3	45	4	--	3	IFN γ	
5	FMO 4	45	4	8	--	IFN γ	
6	FMO 5	45	4	8	3	--	
7	sample	45	4	8	3	IFN γ	
8	unstained	--	--	--	--	--	stimuliert
9	FMO 1	--	4	8	3	IFN γ	
10	FMO 2	45	--	8	3	IFN γ	
11	FMO 3	45	4	--	3	IFN γ	
12	FMO 4	45	4	8	--	IFN γ	
13	FMO 5	45	4	8	3	--	
14	sample	45	4	8	3	IFN γ	

Tabelle 21: IFN γ -Panel

4.2.5.13 FACS-Panel CD73

		Vio F	Blue B	Vio E	Red A	Red B	Ygr E
	CD73 Panel	V450	FITC	BV510	APC-Cy7	AF 700	PE
1	unstained	--	--	--	--	--	--
2	FMO 1	4	3	8	--	19	73
3	FMO 2	--	3	8	45	19	73
4	FMO 3	4	--	8	45	19	73
5	FMO 4	4	3	8	45	19	--
6	FMO 5	4	3	--	45	--	73
7	sample	4	3	8	45	19	73

Tabelle 22: CD73-Panel

4.2.6 Bio-Plex Zytokinmessung aus Serum

Zur Messung von Zytokinen im Serum wurde ein Bio-Plex Assay verwendet. Es wurden IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN γ , TNF- α und VEGF als Analyte gewählt. Für TNF- α war eine einzelne Standardisierungsreagenz (Standard 2) nötig, die anderen acht Analyte waren in einer weiteren Reagenz (Standard 1) kombiniert. Zunächst wurden die Serumproben der gesunden Mäuse aus der Immunophänotypisierung aufgetaut und erneut bei 10000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, um störende Thrombozyten und feinste Partikel sicher zu entfernen. Anschließend wurden die lyophilisierten Standards laut Herstellerangaben vermischt und verdünnt. Anschließend wurde daraus eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei immer 1:4 verdünnt wurde. Anschließend wurden auch die Serumproben 1:4 verdünnt und weiterhin auf Eis gelagert. Letztlich wurden noch die Beads laut Herstellerangaben verdünnt und vor Sonnenlicht geschützt gelagert.

Zu Beginn des Assays wurden 50 μ l der verdünnten Beads pro Well pipettiert und anschließend mit einem Magnet und 100 μ l Waschpuffer zweimal gewaschen. Anschließend wurden ebenfalls 50 μ l der Standardverdünnungen, einer Negativkontrolle und der verdünnten Serumproben in die Wells pipettiert und bei RT und 850 rpm auf einem Rüttler für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Detektionsantikörper verdünnt und nach dreimaligem Waschen der Platte 25 μ l von diesen pro Well pipettiert. Daraufhin folgte eine erneute Inkubation bei RT und 850 rpm auf dem Rüttler für 30 min. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 50 μ l verdünntes Streptavidin-PE pro Well pipettiert und erneut analog zu den vorherigen Schritten auf dem Rüttler inkubiert. Am Ende wurde wiederum dreimal gewaschen und mit 125 μ l Assaypuffer pro Well auf dem Rüttler für 30 s bei 850 rpm resuspendiert und schließlich im zuvor kalibrierten Bio-Plex-Messgerät gemessen.

4.2.7 Statistik

Die in dieser Arbeit präsentierten statistischen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 5, 6 und 7) erstellt. Für den Vergleich von zwei voneinander unabhängigen, ungepaarten Datensätzen wurde stets der ungepaarte t-Test verwendet und mit Mittelwert und Standardabweichung präsentiert. In einem Fall, dem Vergleich des Tumorzumens, wurde zur Überprüfung auf Unterscheidung der Tendenzen der zwei Mausgruppen der Mann-Whitney-Test verwendet. Ebenfalls einmalig wurde zur Überprüfung der

Unterscheidung der Verteilung der Tumorbildung bei den beiden Mausgruppen der Chi-Quadrat-Test angewendet. Um den Zusammenhang der beiden Variablen Tumorumfang und IFN γ -Produktion auf Korrelation zu überprüfen wurde die Spearman-Korrelation genutzt. In allen Fällen wurde Signifikanz ab einem p-Wert von unter 0,05 angenommen und mit einem Stern im Graphen markiert. Höhere Signifikanzen wurden mit zwei Sternen bei einem p-Wert unter 0,01 und drei Sternen ab einem p-Wert unter 0,001 gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung

5.1.1 Bestimmung der günstigsten Menge an Antikörper für die FACS-Messungen

Um einem unnötigen Überschuss an verwendeten Antikörpern bei den FACS-Experimenten entgegenzuwirken und gleichzeitig aber dennoch nicht zu wenig zu verwenden, wurde eine Titration mit jedem verwendeten Antikörper der FACS-Messungen durchgeführt. Wie aus den folgenden Tabellen zu entnehmen ist, ist ein höherer „stain index“ gleichbedeutend mit einer besseren und klareren Färbung bei den Messungen am FACS-Gerät. Die Antikörper wurden stets direkt am Tag ihrer Verwendung verdünnt und nur in der benötigten Menge hergestellt, um mangelhafte Ergebnisse durch unsachgemäße Lagerung auszuschließen.

5.1.1.1 TNK-Panel, T_{reg}-Panel und B-Zell-Panel

Für die Panel „TNK-Panel“, „T_{reg}-Panel“ und „B-Zell-Panel“ wurden die Antikörper CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD44, CD45, CD62L, CD69, NK1.1 und FoxP3 titriert (Tab. 23). Für CD3, CD19 und CD69 ergab der stain index, dass es am günstigsten ist sie mit 1 µl ihrer ursprünglichen Konzentration von 0,2 mg/ml zu verwenden. Für die Antikörper CD8, CD25, CD44, NK1.1 und FoxP3 erwies sich eine Verdünnung von 1:1 auf 0,1mg/ml am vielversprechendsten. Für die Antikörper CD4, CD45 und CD62L wurde schließlich eine Verdünnung von 1:3 zu einer Konzentration von 0,05mg/ml ermittelt. Von den jeweils verdünnten Antikörpern wurde dann je 1 µl eingesetzt.

Titration 500.000 Zellen/100µl									
	Konzentration	Zellen (mean)	Positiv (mean)	Negativ (mean)	SD Negativ	2x SD Negativ	MFI Positiv	MFI Negativ	Stain Index
CD3	0.2	386	1694	96	96	192	2080	482	8,32
CD3	0.1	458	1799	120	1100	2200	2257	578	0,76
CD3	0.05	269	1313	88	90	180	1582	357	6,81
CD4	0.2	567	1394	35	130	260	1961	602	5,23

CD4	0.1	247	1707	32	59	118	1954	279	14,19
CD4	0.05	242	1727	30	56	112	1969	272	15,15
CD8	0.2	359	3992	52	713	1426	4351	411	2,76
CD8	0.1	251	2843	44	48	96	3094	295	29,16
CD8	0.05	152	1610	42	47	94	1762	194	16,68
CD19	0.2	262	820	65	115	230	1082	327	3,28
CD19	0.1	197	699	65	108	216	896	262	2,94
CD19	0.05	181	699	64	106	212	880	245	3,00
CD25	0.2	41	653	33	78	156	694	74	3,97
CD25	0.1	34	627	29	61	122	661	63	4,90
CD25	0.05	29	516	26	53	106	545	55	4,62
CD44	0.2	299	661	17	42	84	960	316	7,67
CD44	0.1	296	691	18	37	74	987	314	9,09
CD44	0.05	268	632	19	34	68	900	287	9,01
CD45	0.2	5018	7742	95	2662	5324	12760	5113	1,44
CD45	0.1	4552	7447	47	99	198	11999	4599	37,37
CD45	0.05	4501	7563	42	95	190	12064	4543	39,58
CD62L	0.2	526	4593	327	393	786	5119	853	5,43
CD62L	0.1	274	3782	237	296	592	4056	511	5,99
CD62L	0.05	214	3681	200	259	518	3895	414	6,72
CD69	0.2	138	724	14	218	436	862	152	1,63
CD69	0.1	61	723	25	797	1594	784	86	0,44

CD69	0.05	38	732	22	1085	2170	770	60	0,33
NK1.1	0.2	593	1838	307	8673	17346	2431	900	0,09
NK1.1	0.1	82	1430	8	46	92	1512	90	15,46
NK1.1	0.05	82	1718	20	1606	3212	1800	102	0,53
FOXP3	0.2	48	382	46	1583	3166	430	94	0,11
FOXP3	0.1	29	442	27	74	148	471	56	2,80
FOXP3	0.05	25	414	24	72	144	439	49	2,71

Tabelle 23: Mengenbestimmung der Antikörper für das „TNK-Panel“, „B-Zell-Panel“ und „T_{reg}-Panel“

Ergebnisse der Titration und gelbe Markierung des besten stain index der verwendeten Antikörper des TNK-, B-Zell und T_{reg}-Panels, je 1 µl der Konzentrationen 0,2, 0,1 und 0,05 mg/ml

5.1.1.2 DC-MDSC-Panel

Für das Panel „DC-MDSC-Panel“ wurden die Antikörper CD11b, CD11c, CD45R, CD80, CD86, F4/80, Ly6-C und Ly6-G titriert (Tab. 24). Für die Antikörper CD11b, CD45R, F4/80, Ly6-C und Ly6-G wurde eine ideale Verdünnung von 1:1 zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml ermittelt. Für die Antikörper CD11c, CD80 und CD86 ergab sich schließlich eine Verdünnung von 1:3 zu einer Konzentration von 0,05 mg/ml. Von den jeweils verdünnten Antikörpern wurde dann je 1 µl eingesetzt.

Titration 500.000 Zellen/100µl									
	Konzentration	Zellen (mean)	Positiv (mean)	Negativ (mean)	SD Negativ	2x SD Negativ	MFI Positiv	MFI Negativ	Stain Index
CD11b	0.2	110	1280	70	1699	3398	1390	180	0,36
CD11b	0.1	86	1147	51	78	156	1233	137	7,03

CD11b	0.05	79	1077	49	74	148	1156	128	6,95
CD11c	0.2	65	512	45	62	124	577	110	3,77
CD11c	0.1	52	517	37	58	116	569	89	4,14
CD11c	0.05	40	464	30	52	104	504	70	4,17
CD45R	0.2	1122	1811	412	8421	16842	2933	1534	0,08
CD45R	0.1	346	751	26	46	92	1097	372	7,88
CD45R	0.05	259	611	27	45	90	870	286	6,49
CD80	0.2	268	1519	165	3990	7980	1787	433	0,17
CD80	0.1	160	1554	99	1573	3146	1714	259	0,46
CD80	0.05	118	1335	86	166	332	1453	204	3,76
CD86	0.2	208	604	69	1764	3528	812	277	0,15
CD86	0.1	166	627	58	86	172	793	224	3,31
CD86	0.05	162	662	58	81	162	824	220	3,73
F4/80	0.2	430	2311	76	2870	5740	2741	506	0,39
F4/80	0.1	284	2065	38	174	348	2349	322	5,82
F4/80	0.05	190	1721	30	149	298	1911	220	5,67
Ly6-C	0.2	1597	3670	388	9045	18090	5267	1985	0,18
Ly6-C	0.1	735	2650	17	48	96	3385	752	27,43
Ly6-C	0.05	444	1997	25	847	1694	2441	469	1,16
Ly6-G	0.2	208	10466	149	227	454	10674	357	22,72
Ly6-G	0.1	180	10321	126	220	440	10501	306	23,17
Ly6-G	0.05	108	2971	106	208	416	3079	214	6,89

Tabelle 24: Mengenbestimmung der Antikörper für das „DC-MDSC-Panel“

Ergebnisse der Titration und gelbe Markierung des günstigsten stain index der verwendeten Antikörper des DC-MDSC-Panels, je 1 µl der Konzentrationen 0,2, 0,1 und 0,05 mg/ml

5.1.1.3 IFN γ -Panel

Im „IFN γ -Panel“ wurden zwar bis auf den IFN γ die identischen Antikörper wie im „TNK-Panel“ eingesetzt, jedoch wurde aufgrund der reduzierten Zellzahl und verdoppelten Menge FACS-Puffer pro FACS-tube eine erneute Titration (Tab. 25) durchgeführt. So ergab sich für den Antikörper CD8 der beste stain index bei 1 µl im unverdünnten Zustand. Für die Antikörper CD3 und CD45 wurde eine 1:1 Verdünnung zur Konzentration 0,1 mg/ml ermittelt und für die Antikörper CD4 und IFN γ eine Verdünnung von 1:3 zu einer Konzentration von 0,05mg/ml. Von den jeweils verdünnten Antikörpern wurde dann je 1 µl eingesetzt.

Titration 200.000 Zellen/200µl									
	Konzentration	Zellen (mean)	Positiv (mean)	Negativ (mean)	SD Negativ	2x SD Negativ	MFI Positiv	MFI Negativ	Stain Index
CD45	5µl	7558	8352	239	129	258	15910	7797	31,45
CD45	2µl	5350	6056	180	103	206	11406	5530	28,52
CD45	0,2	3416	3927	139	104	208	7343	3555	18,21
CD45	0,1	4838	5505	149	96	192	10343	4987	27,90
CD45	0,05	3016	3490	136	101	202	6506	3152	16,60
CD4	5µl	9428	26532	155	158	316	35960	9583	83,47
CD4	2µl	4644	19168	121	140	280	23812	4765	68,03
CD4	0,2	2323	11771	100	130	260	14094	2423	44,89
CD4	0,1	667	4022	61	122	244	4689	728	16,23
CD4	0,05	2624	18328	63	123	246	20952	2687	74,25
CD8	5µl	285	1904	144	116	232	2189	429	7,59

CD8	2µl	229	2084	101	97	194	2313	330	10,22
CD8	0,2	202	2445	78	88	176	2647	280	13,45
CD8	0,1	94	1179	44	75	150	1273	138	7,57
CD8	0,05	121	1575	50	76	152	1696	171	10,03
CD3	5µl	2299	3237	274	172	344	5536	2573	8,61
CD3	2µl	1911	4555	276	170	340	6466	2187	12,59
CD3	0,2	1948	7318	243	156	312	9266	2191	22,68
CD3	0,1	1018	5307	118	113	226	6325	1136	22,96
CD3	0,05	656	3611	88	104	208	4267	744	16,94
IFNγ	5µl	-1588	135295	-11482	2142	4284	133707	-13070	34,26
IFNγ	2µl	143	35133	-1830	976	1952	35276	-1687	18,94
IFNγ	0,2	-6696	165545	-22507	4050	8100	158849	-29203	23,22
IFNγ	0,1	103	8318	-144	1148	2296	8421	-41	3,69
IFNγ	0,05	262	7610	141	184	368	7872	403	20,30

Tabelle 25: Mengenbestimmung der Antikörper für das „IFNγ-Panel“

Ergebnisse der Titration und gelbe Markierung des günstigsten stain index der verwendeten Antikörper des IFNγ-Panels in den Mengen 5µl , 2µl und 1µl der Originalkonzentration 0,2 mg/ml und je 1µl der Konzentration 0,1 und 0,05 mg/ml

5.1.1.4 CD73-Panel

Ein Sonderfall bei der Titration bestand bei der Titration des „CD73-Panel“. Durch Errechnung des stain index (Tab. 26) konnte in diesem Fall aufgrund der niedrigen Werte, die sich nahezu glichen, kein Unterscheid bei den verschiedenen Konzentrationen ausgemacht werden. Aufgrund der Optik im Dotplot FACS-Bild, stellte sich jedoch die Verdünnung des Antikörpers zur Konzentration 0,1 mg/ml als am besten heraus. Auf die Titration der restlichen Antikörper dieses Panels konnte verzichtet werden, da hier die Zellen in der

gleichen Konzentration und Menge im FACS-tube eingesetzt wurden wie bereits in der Titration des „TNK-Panel“ ermittelt.

Titration 500.000 Zellen/100µl									
	Konzentration	Zellen (mean)	Positiv (mean)	Negativ (mean)	SD Negativ	2x SD Negativ	MFI Positiv	MFI Negativ	Stain Index
CD73	5µl	6787	14616	1837	20068	40136	21403	8624	0,32
CD73	2µl	5091	14370	1285	15431	30862	19461	6376	0,42
CD73	0,2	6438	14209	4013	30885	61770	20647	10451	0,17
CD73	0,1	3312	9802	1744	19630	39260	13114	5056	0,21
CD73	0,05	2475	7636	1417	17528	35056	10111	3892	0,18

Tabelle 26: Mengenbestimmung der Antikörper für das „CD73-Panel“

Ergebnisse der Titration des Antikörpers CD73 in den Mengen 5µl , 2µl und 1µl der Originalkonzentration 0,2 mg/ml und je 1µl der Konzentration 0,1 und 0,05 mg/ml

5.1.2 Genotypisierung der CD73KO-Nachzucht

Im Laufe der orthotopen Injektionen von Panc02 Zellen in das Pankreas von CD73KO-Mäusen war es nötig eine Zucht ebendieser Mäuse anzulegen und die daraus entstandenen Nachkommen eindeutig auf eine homozygote Ausprägung des Knockouts zu genotypisieren. Die Verpaarung erfolgte anhand des Stammbaums der Elterntiere unter Vermeidung zu enger Verwandtschaftsbeziehungen und anhand der positiven Ergebnisse vergangener Würfe. Die Auswertung der Bandenbildung nach PCR mittels Gelelektrophorese wurde anfangs unter UV-Licht durchgeführt (Abb. 3A) und später durch ein ChemieDoc Auswertungsgerät (Abb. 3B). Da bei neuen Verpaarungen stets darauf geachtet wurde, wenn möglich ausschließlich Knockoutmäuse miteinander zu verpaaren, ergaben alle durchgeführten Genotypisierungen einen homozygoten CD73 Knockout.

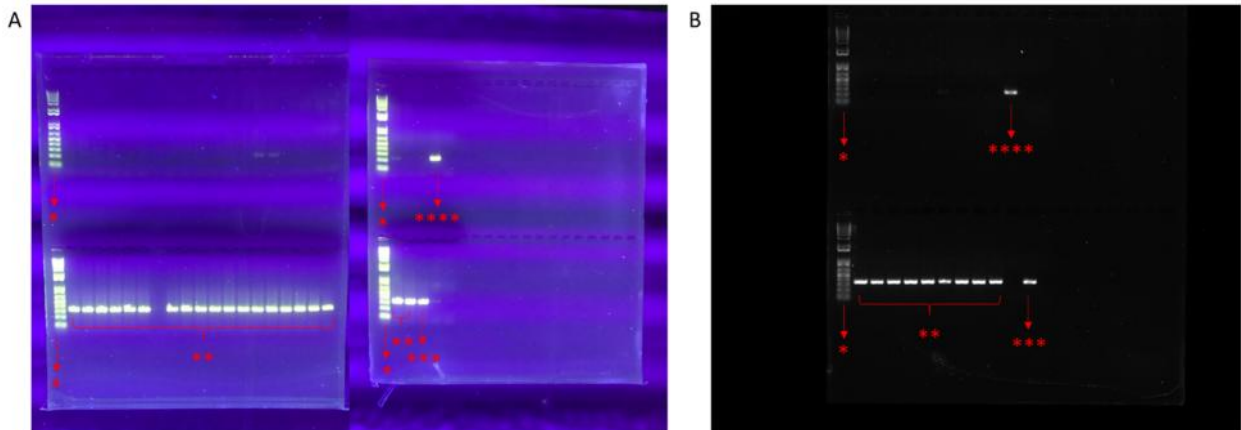


Abbildung 3: Genotypisierung von Ohrbiopsien selbst gezüchteter CD73KO Nachkommen im Alter von 6 Wochen

[A]: Genotypisierung mittels PCR Gelelektrophorese ausgewertet unter UV-Licht, zu sehen sind eine ladder zur Größendefinition mit den Banden für von unten beginnend 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 10000 und 150000 bp(*), Banden für homozygote CD73KO-Mäuse (**), Positivkontrolle für homozygote CD73KO (***) und Negativkontrolle für homozygote CD73KO (****)

[B]: Genotypisierung mittels PCR Gelelektrophorese, ausgewertet im ChemieDoc, zu sehen sind eine ladder zur Größendefinition mit den Banden für von unten beginnend 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 10000 und 150000 bp(*), Banden für homozygote CD73KO-Mäuse (**), Positivkontrolle für homozygote CD73KO (***) und Negativkontrolle für homozygote CD73KO (****)

5.1.3 Überlebensdauer der Panc02 Zellen

Da die Zellen der murinen Linie Panc02 unter OP-Bedingungen in der Regel 4 Stunden, beziehungsweise unter Einberechnung zeitlicher Verzögerungen bei der OP bis zu 6 Stunden in PBS auf Eis gestellt wurden, wurde deren Überlebensfähigkeit unter simulierten OP-Bedingungen ermittelt. Bei der Lebend-Tot-Färbung im FACS, sowie der simultanen Trypanblaufärbung und Zählung unter dem Lichtmikroskop ergab sich innerhalb der ersten 6 Stunden bei stündlicher Messung kein relevanter Anstieg der toten Zellen, die eine orthotope Injektion verfälschen und/oder behindern würden (Abb. 4). Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen fiel lediglich von anfangs 91,7% auf 88,6% nach 6 Stunden. Die anschließende Postivkontrolle durch töten mit Ethanol-70% ließ den Anteil der lebenden Zellen auf 0,6 % fallen.

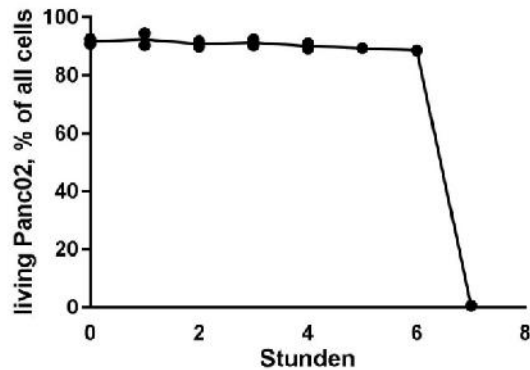


Abbildung 4: Überlebensfähigkeit von Panc02-Zellen unter simulierten OP-Bedingungen

Stündliche Messung mittels FACS mit 7AAD Lebend-Tot-Färbung sowie simultaner Zählung der toten Zellen in Neubauer Zählkammer mit Trypanblau-Färbung, % lebende Zellen der Zelllinie Panc02 unter simulierten OP-Bedingungen, bei Stunde 7 wurde mit Ethanol-70% getötet

5.1.4 Panel der Immunophänotypisierung

Wie anfangs in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, ist die immunsupprimierende Rolle des von CD73 produzierten Adenosins des Öfteren gezeigt worden. Was ein Knockout des CD73 jedoch aus immunologischer Sicht an dem individuellen immunologischen Profil einer Maus verändert und ob diese Veränderungen Hinweise zum besseren Verständnis des Wirkmechanismus von CD73 und seiner Rolle im Adenosinmetabolismus liefern, sollte mit Hilfe einer umfangreichen Immunophänotypisierung von Wildtyp C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen CD73KO-Mäusen geklärt werden. Aufgrund seiner Rolle als sehr wichtiger Teil des lymphatischen Systems wurden zum Vergleich die Milzen als Quelle der Splenozyten in einer Einzelsuspension von ausschließlich gesunden Mäusen verwendet.

5.1.4.1 TNK-Panel

Im verwendeten „TNK-Panel“ wurden die CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen naive, Effektor- und Memory-T-Zellen analysiert. Des Weiteren wurde die selbige Messung von Subpopulationen bei CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Außerdem wurden NK-Zellen und NKT-Zellen, sowie jeweils deren Aktivierung mittels CD69 dargestellt.

5.1.4.1.1 Gatingstrategie

Die Darstellung und deutliche Trennung positiver sowie negativer Zellen in Bezug auf die immunophänotypischen Oberflächenmerkmale erfolgte im „TNK-Panel“ mittels Dotplots (Abb. 5A). Zunächst wurde aus allen Events eine Gruppe von lebenden Zellen definiert. Aus

diesen wurden alle CD45⁺ Leukozyten gewählt, woraus wiederum eine CD3⁺ und eine CD3⁻ Population gated wurde. Aus den CD3⁺ T-Lymphozyten wurde durch Gegenüberstellung von CD4 und CD8 deren positive Populationen identifiziert und hieraus wiederum deren Subpopulationen durch Gegenüberstellung von CD44 und CD62L. Weiterhin wurde aus den CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten die NKT-Zellen ermittelt und mit der Gegenüberstellung von CD69 deren aktivierter Teil. Gleiches wurde auch mit den NK-Zellen aus den CD45⁺CD3⁻ Zellen durchgeführt.

A

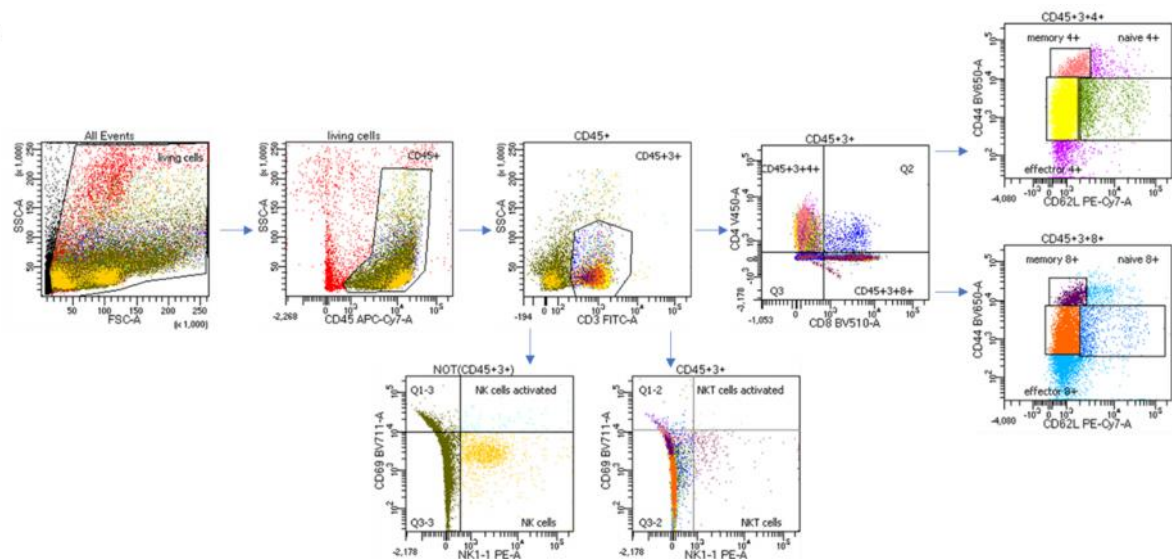


Abbildung 5: Gatingstrategie des „TNK-Panel“

[A]: Dotplot FACS-Bilder der Gatingstrategie des TNK-Panels beispielhaft anhand einer CD73KO-Maus

5.1.4.1.2 Unstained und FMOs

Um einerseits bei den verwendeten Antikörpern sicherzustellen, dass sie ausschließlich positive Events in dem Laserkanal zeigen, der passend zu ihrem gekoppelten Flourochrom ist und nicht in andere Kanäle falsch positive Events überstrahlen, wurden von allen verwendeten Antikörpern FMOs (Abb. 6B-L) sowie eine ungefärbte Kontrolle (Abb. 6A) erstellt. Andererseits lieferten diese FMOs im Falle von nicht eindeutig trennbaren positiven und negativen Populationen eine Hilfe das Gate für die positive Population an der richtigen Stelle zu platzieren. Diese ungefärbte Kontrolle und die FMOs wurden bei jeder einzelnen Messung erneut zusätzlich zu allen Proben gefärbt, da man so auf die individuellen Verschiebungen der Populationen zwischen den einzelnen Experimenten und Tagen reagieren und neu einstellen konnte. Wie in Abbildung 6 zu sehen, kam es bei den

verwendeten Antikörpern zu entweder garkeiner oder nur zu vernachlässigbaren, falsch positiven Events im Bereich von maximal wenigen Promille.

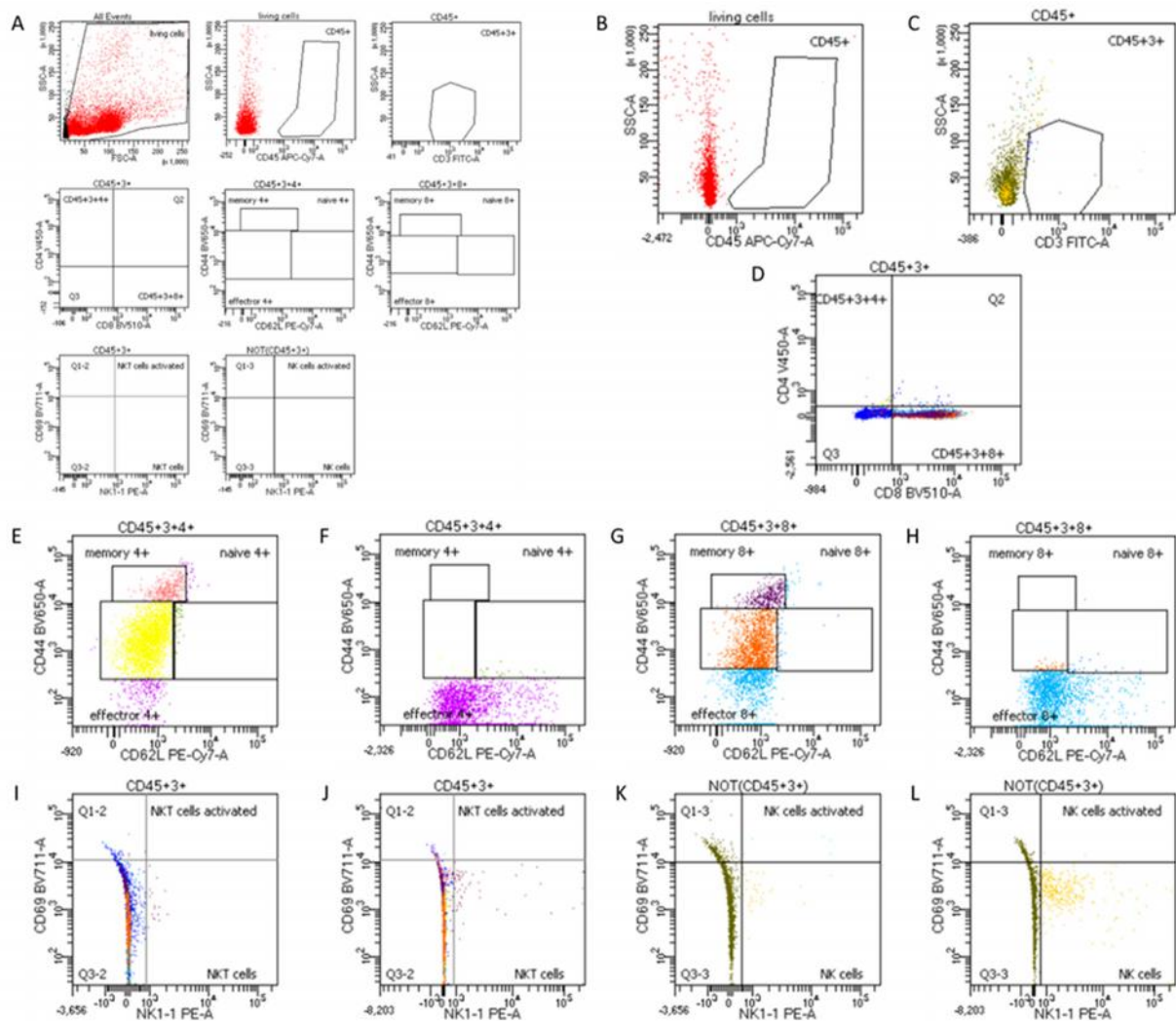


Abbildung 6: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des „TNK-Panel“

[A]: ungefärbte Kontrolle Dotplots FACS-Bild **[B]:** FMO für CD45 Dotplot FACS-Bild **[C]:** FMO für CD3 Dotplot FACS-Bild **[D]:** FMO für CD4 Dotplot FACS-Bild **[E]:** FMO für CD62L aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Dotplot FACS-Bild **[F]:** FMO für CD44 aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Dotplot FACS-Bild **[G]:** FMO für CD62L aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Dotplot FACS-Bild **[H]:** FMO für CD44 aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Dotplot FACS-Bild **[I]:** FMO für NK1.1 aus CD45⁺3⁺ Dotplot FACS-Bild **[J]:** FMO für CD69 aus CD45⁺3⁺ Dotplot FACS-Bild **[K]:** FMO für NK1.1 aus CD45⁺3⁺ Dotplot FACS-Bild **[L]:** FMO für CD69 aus CD45⁺3⁺ Dotplot FACS-Bild

5.1.4.2 B-Zell-Panel

Im verwendeten „B-Zell-Panel“ wurden ausschließlich CD45⁺CD3⁻CD19⁺ B-Zellen der Mausstämmen C57BL/6 und CD73KO aus Milzeinzelsuspensionen gesunder Mäuse gemessen.

5.1.4.2.1 Gatingstrategie

Auch im B-Zell-Panel wurden für die Identifizierung und saubere Trennung der einzelnen Populationen Dotplots verwendet. Analog zum TNK-Panel wurden zunächst aus SSC und FSC

die lebenden Zellen definiert und aus diesen die CD45⁺ Leukozyten. Aus diesen wurde durch Gegenüberstellung von CD3 und CD19 die Population der CD45⁺CD3⁺CD19⁺ B-Zellen klar sichtbar (Abb. 7A).

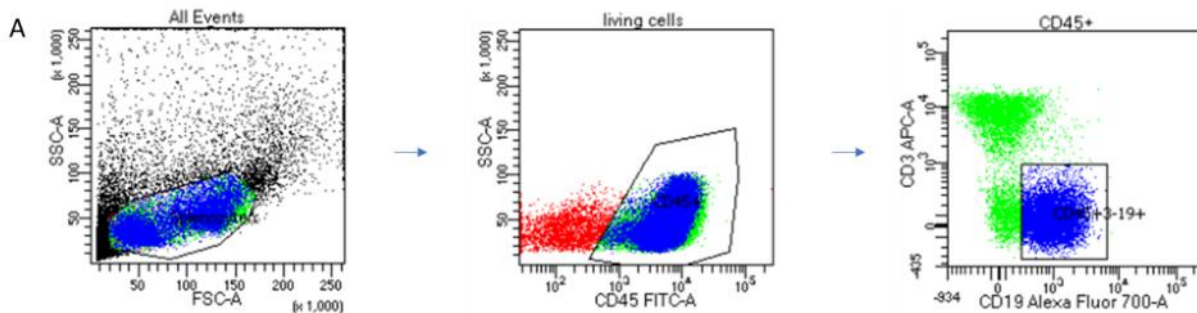


Abbildung 7: Gatingstrategie des „B-Zell-Panel“

[A]: Dotplot FACS-Bilder der Gatingstrategie des B-Zell-Panels beispielhaft anhand einer CD73KO-Maus

5.1.4.2.2 Unstained und FMOs

Bei den Kontrollen für das B-Zell-Panel wurden weder bei der ungefärbten Kontrolle (Abb. 8A), der FMO für CD45 (Abb. 8B), der FMO für CD3 (Abb. 8C) noch der FMO für CD19 (Abb. 8D) falsch positiv überstrahlende Events sichtbar.

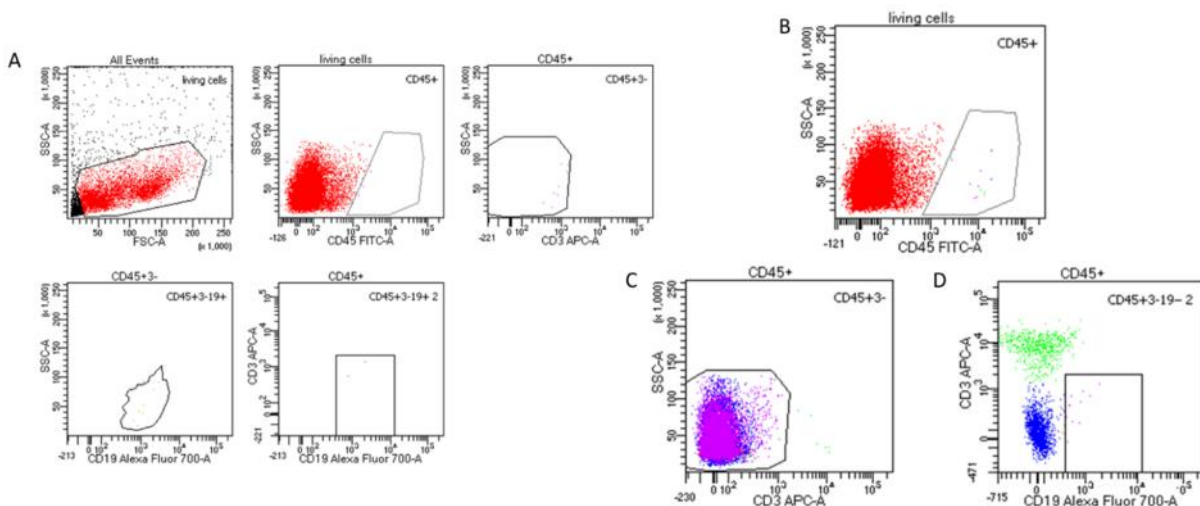


Abbildung 8: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des „B-Zell-Panel“

[A]: ungefärbte Kontrolle FACS-Bild Dotplots **[B]:** FMO für CD45 FACS-Bild Dotplot **[C]:** FMO für CD3 FACS-Bild Dotplot **[D]:** FMO für CD19 FACS-Bild Dotplot

5.1.4.3 *T_{reg}*-Panel

Das *T_{reg}*-Panel wurde separat zum TNK-Panel angelegt, da sich nach mehrmaligem Versuchen herausstellte, dass die Menge der verschiedenen Flourochrome in diesem Fall zu viel, die gesamte Messung undeutlicher und die einzelnen Populationen schwieriger zu identifizieren waren. Deshalb wurden im *T_{reg}*-Panel die bereits im TNK-Panel verwendeten Antikörper CD45, CD3 und CD4 um die Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD25 und den intrazellulär gelegenen Marker FoxP3 ergänzt.

5.1.4.3.1 Gatingstrategie

Für die Gatingstrategie (Abb. 9A) erwies sich wie zuvor die Wahl der Dotplots am besten. Aus allen Zellen wurden per SSC und FSC wieder die lebenden Zellen definiert und aus diesen die CD45⁺ Leukozyten. Hieraus ließen sich dann die CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten und aus diesen die CD45⁺CD3⁺CD4⁺ T-Zellen identifizieren. Durch die Gegenüberstellung der beiden Marker CD25 und FoxP3 ließen sich drei Subpopulationen aus den T-Zellen nachweisen.

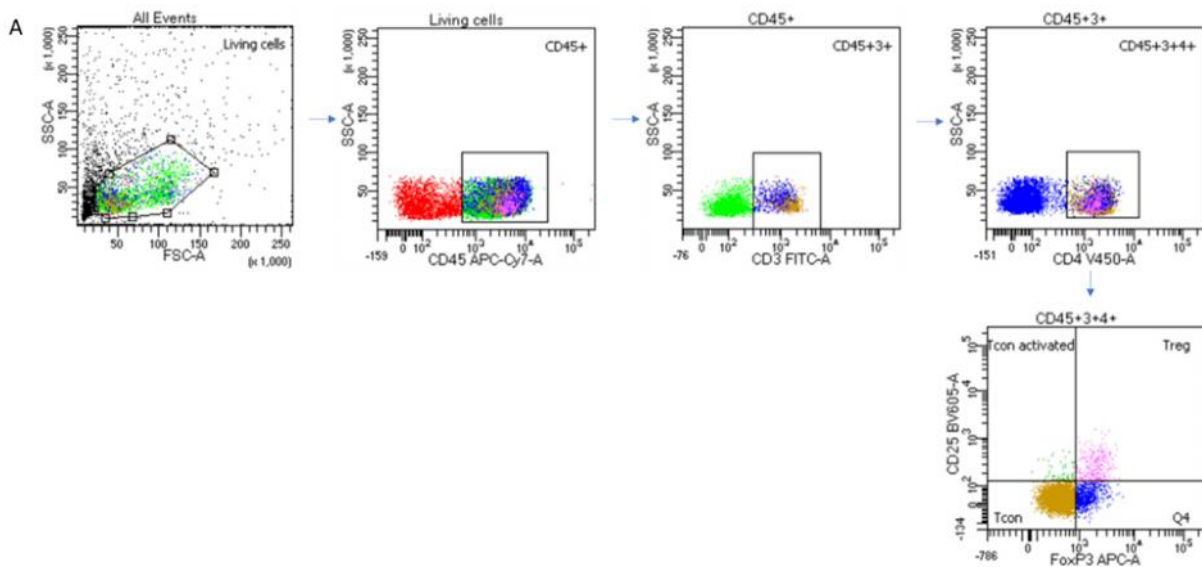


Abbildung 9: Gatingstrategie des „*T_{reg}*-Panel“

[A]: Gatingstrategie des *T_{reg}*-Panels beispielhaft anhand einer CD73KO-Maus

5.1.4.3.2 Unstained und FMOs

Da es sich bei den gewählten Antikörpern bei CD45, CD3 und CD4 um die bereits verwendeten und klar abtrennbaren Populationen aus dem TNK-Panel handelte, wurde in diesem Panel auf die Erstellung von FMOs für diese drei Antikörper verzichtet. Durch die Anfertigung einer obligatorischen ungefärbten Kontrolle (Abb. 10A) konnte dennoch die

Güte der Milzeinzelsuspensionen gezeigt werden. Die FMOs für die Antikörper CD25 (Abb. 10B) sowie FoxP3 (Abb. 10C) zeigten keinerlei falsch positive Events und halfen sehr gut das Gate für die eindeutige Identifikation der drei gesuchten Subpopulationen korrekt zu setzen.

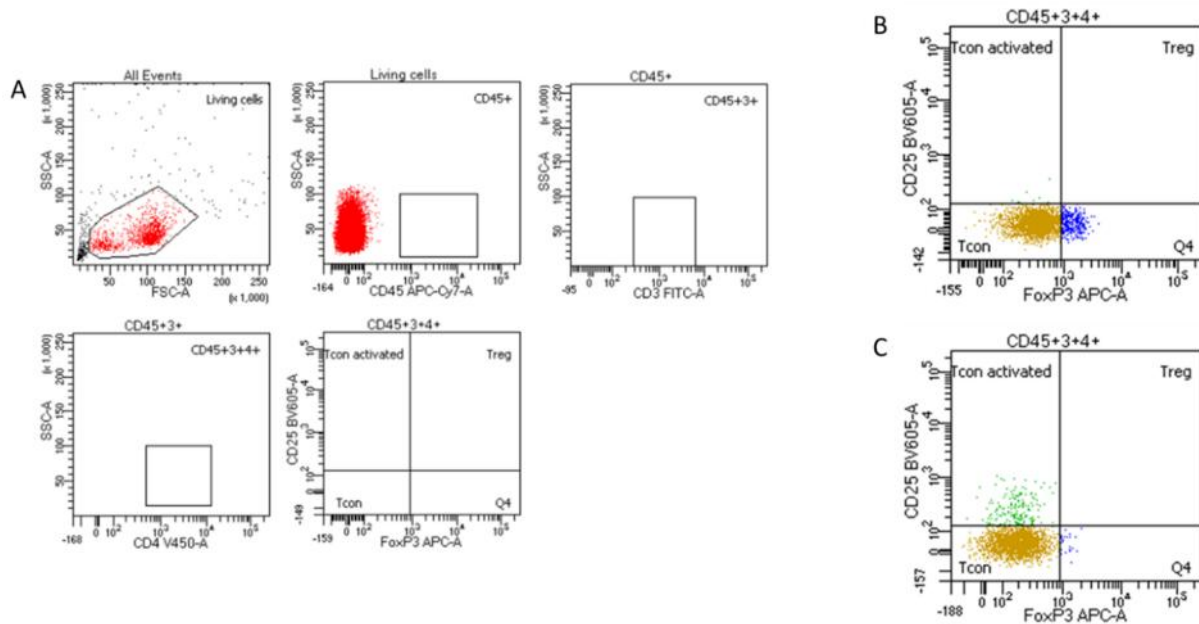


Abbildung 10: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des „Treg-Panel“

[A]: ungefärbte Kontrolle FACS-Bild Dotplots **[B]:** FMO für CD25 FACS-Bild Dotplot **[C]:** FMO für FoxP3 FACS-Bild Dotplot

5.1.4.4 DC-MDSC-Panel

Für das „DC-MDSC-Panel“ wurden die Antikörper CD45, CD45R, CD11b und CD11c zur Identifizierung der dendritischen Zellen und zusätzlich CD80 und CD86 für ihren Aktivierungsgrad verwendet. Zur Detektion von MDSCs und Makrophagen kamen außerdem die Antikörper Ly6-C, Ly6-G und F4/80 zum Einsatz.

5.1.4.4.1 Gatingstrategie

Da sich die in diesem Panel gesuchten Zellpopulationen teils im sehr niedrigen Prozentbereich oder darunter befanden, wurde je nach Sichtbarkeit der Population im Dotplot die Wahl des Histogramms bevorzugt (Abb. 11A). Zunächst wurden per SSC und FSC die lebenden Zellen identifiziert um aus diesen die CD45⁺ Leukozyten zu erkennen. Aus diesen wurde durch Gegenüberstellung von CD11b und CD11c die Population der doppelt positiven CD11b⁺CD11c⁺ konventionellen dendritischen Zellen (cDC) myeloiden Ursprungs identifiziert. Diese wurde mittels CD80 und CD86 auf ihren Grad der Aktivierung hin überprüft. Aus der CD11b⁻CD11c⁺ Population wurden die CD45R⁺ plasmazytoiden

dendritischen Zellen (pDC) lymphoiden Ursprungs identifiziert und auch bei diesen mittels CD80 und CD86 die Aktivierung ermittelt. Aus den CD45⁺CD11b⁺ Zellen wurden durch Gegenüberstellung von Ly6-C und Ly6-G die zwei Populationen der MDSCs identifiziert. Ly6-G⁺Ly6-C^{low} polymorphnukleäre MDSCs (PMN-MDSC), auch bekannt als granulozytäre MDSC, und Ly6-G⁻Ly6-C^{high} monozytäre MDSCs (M-MDSC). Aus den gesamten CD45⁺CD11b⁺Ly6-G⁻ Zellen wurden mittels F4/80 die CD45⁺CD11b⁺Ly6-G⁻F4/80⁺ Makrophagen identifiziert.

Abbildung 11: Gatingstrategie des „DC-MDSC-Panel“

5.1.4.4.2 Unstained und FMOs

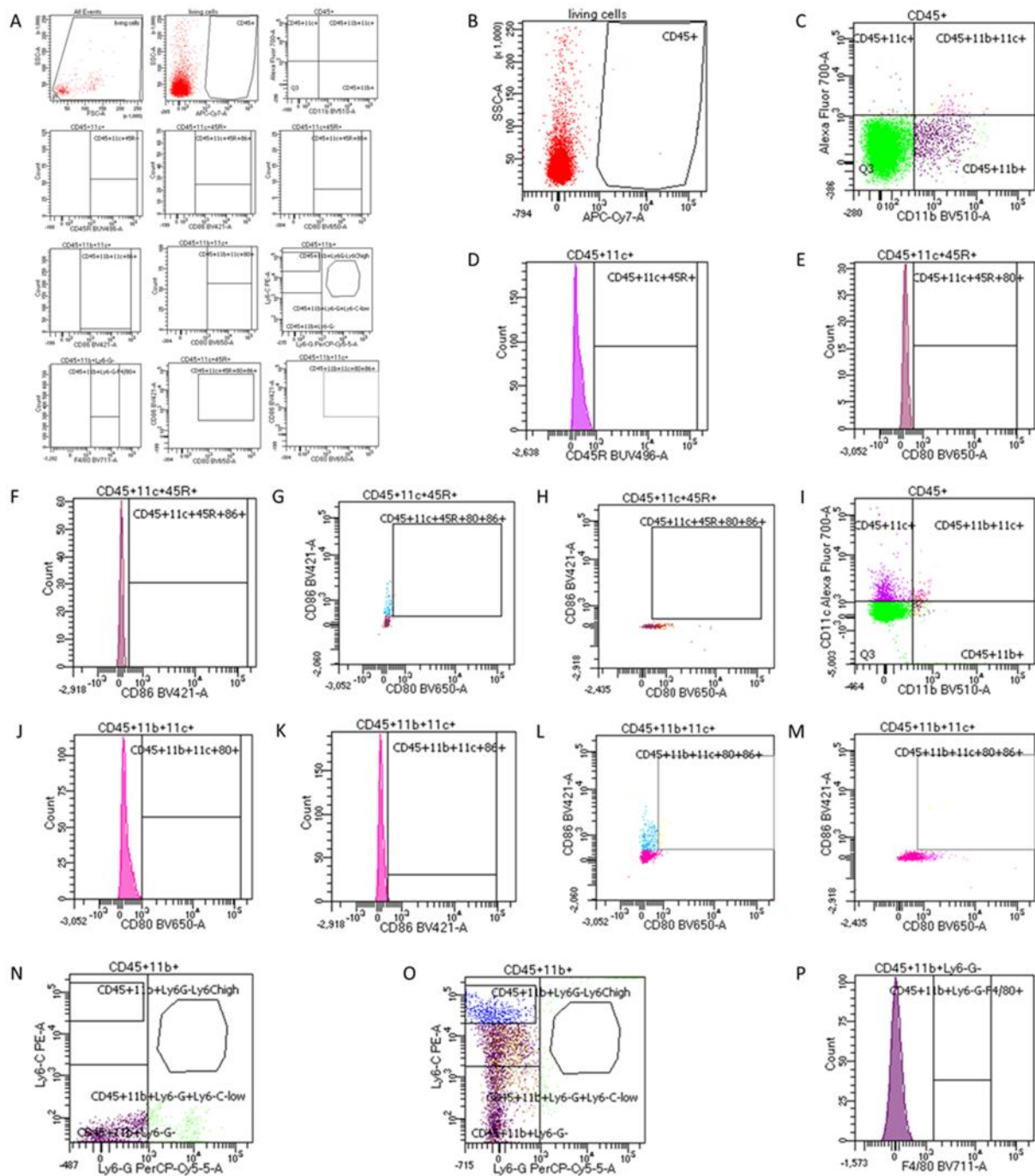


Abbildung 12: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des DC-MDSC-Panels

[A]: ungefärbte Kontrolle FACS-Bild Dotplots [B]: FMO für CD45 FACS-Bild Dotplot [C]: FMO für CD11c FACS-Bild Dotplot [D]: FMO für CD45R FACS-Bild Dotplot [E]: FMO für CD80 aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ FACS-Bild Histogramm [F]: FMO für CD86 aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ FACS-Bild Histogramm [G]: FMO für CD80 aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ FACS-Bild Dotplot [H]: FMO für CD86 aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ FACS-Bild Dotplot [I]: FMO für CD11b aus CD45⁺ FACS-Bild Dotplot [J]: FMO für CD80 aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ FACS-Bild Histogramm [K]: FMO für CD86 aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ FACS-Bild Histogramm [L]: FMO für CD80 aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ FACS-Bild Dotplot [M]: FMO für CD86 aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ FACS-Bild Dotplot [N]: FMO für Ly6-C FACS-Bild Dotplot [O]: FMO für LY6-G FACS-Bild Dotplot [P]: FMO für F4/80 FACS-Bild Histogramm

5.1.5 IFN γ -Panel

In diesem Experiment sollte sowohl in Einzelsuspensionen aus den Primärtumoren als auch aus den Milzen aller, also auch der nicht tumortragenden CD73KO-Mäuse, durchflusszytometrisch die IFN γ -produzierenden Zellen ermittelt werden. Die Tumoreinzelsuspension sollte hierbei dazu dienen, eine erhöhte Migration etwaiger Zellen in die direkte Tumormikroumgebung festzustellen. Die Milzeinzelsuspension hingegen sollte, als wichtiges immunologisches Organ, ähnlich wie bei der Immunophänotypisierung, einen Überblick des immunologischen Status quo der tumorinjizierten Mäuse liefern und gleichzeitig in Kombination mit der Messung der Tumoren eventuelle Migrationen der Zellen belegen. IFN γ ist durch seine immunregulatorischen und unter anderem antitumoralen Eigenschaften ein wesentlicher Baustein bei der immunologischen Abwehr eines Tumors. Um jene Zellen zu identifizieren, welche IFN γ produzieren, wurden in diesem Panel neben dem Antikörper für IFN γ noch CD45, CD3, CD4 und CD8 verwendet. Um eventuelle Veränderungen bzw. Unterschiede zwischen den Mausgruppen in jedem Fall entdecken zu können, wurde IFN γ auf jeder möglichen Ebene gemessen und verglichen. Außerdem wurde jede Einzelsuspension in einer unstimulierten und einer zuvor mit BLK inkubierten Version verwendet, um die Bereitschaft und das Maß der einzelnen Zellen auf einen Stimulus hin IFN γ zu produzieren, ebenfalls messen zu können. Zusätzlich hierzu wurden die T-Lymphozyten gesamt, die CD4 $^{+}$ T-Zellen und die CD8 $^{+}$ -T-Zellen quantifiziert und verglichen.

5.1.5.1 Gatingstrategie

Bei der Gatingstrategie wurden ausschließlich Dotplots verwendet (Abb. 13A). Aus den lebenden Zellen wurden die CD45 $^{+}$ Leukozyten identifiziert, woraus wiederum die CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten ermittelt wurden. Die CD4 $^{+}$ T-Zellen wurden einerseits aus den CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten und ergänzend aus den CD45 $^{+}$ Leukozyten identifiziert. Auf gleiche Weise wurden die CD8 $^{+}$ -T-Zellen ermittelt. IFN γ^{+} Zellen wurden letztlich je auf den Ebenen der CD45 $^{+}$ Leukozyten, der CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten, der CD45 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen, der CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen, der CD45 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T-Zellen und der CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T-Zellen identifiziert.

A

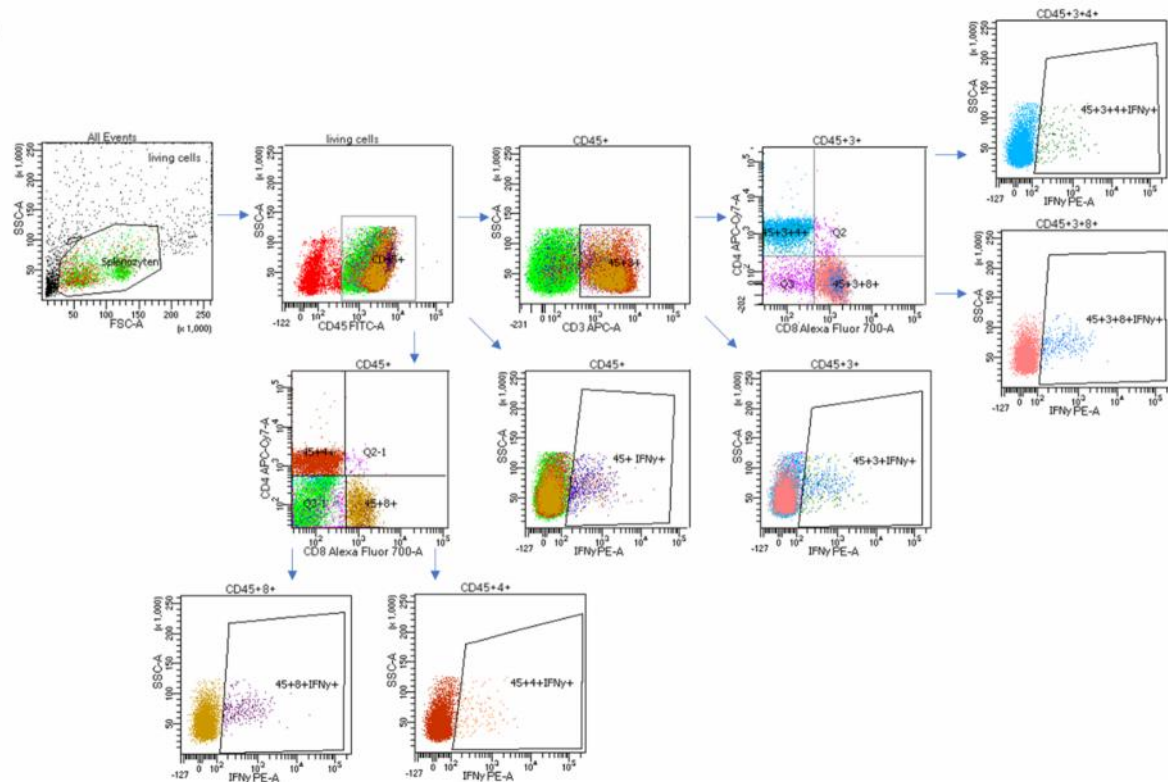


Abbildung 13: Gatingstrategie des „IFN γ -Panel“

[A]: Dotplot FACS-Bilder der Gatingstrategie des IFN γ -Panels beispielhaft anhand einer CD73KO-Maus

5.1.5.2 Unstained und FMOs

Bei den Kontrollen für das IFN γ -Panel wurden weder bei der ungefärbten Kontrolle (Abb. 14A), der FMO für CD45 (Abb. 14B), der FMO für CD3 (Abb. 14C), der FMO für CD4 (Abb. 14D), der FMO für CD8 (Abb. 14E), noch der FMOs für IFN γ (Abb. 14F-K) falsch positiv überstrahlende Events sichtbar.

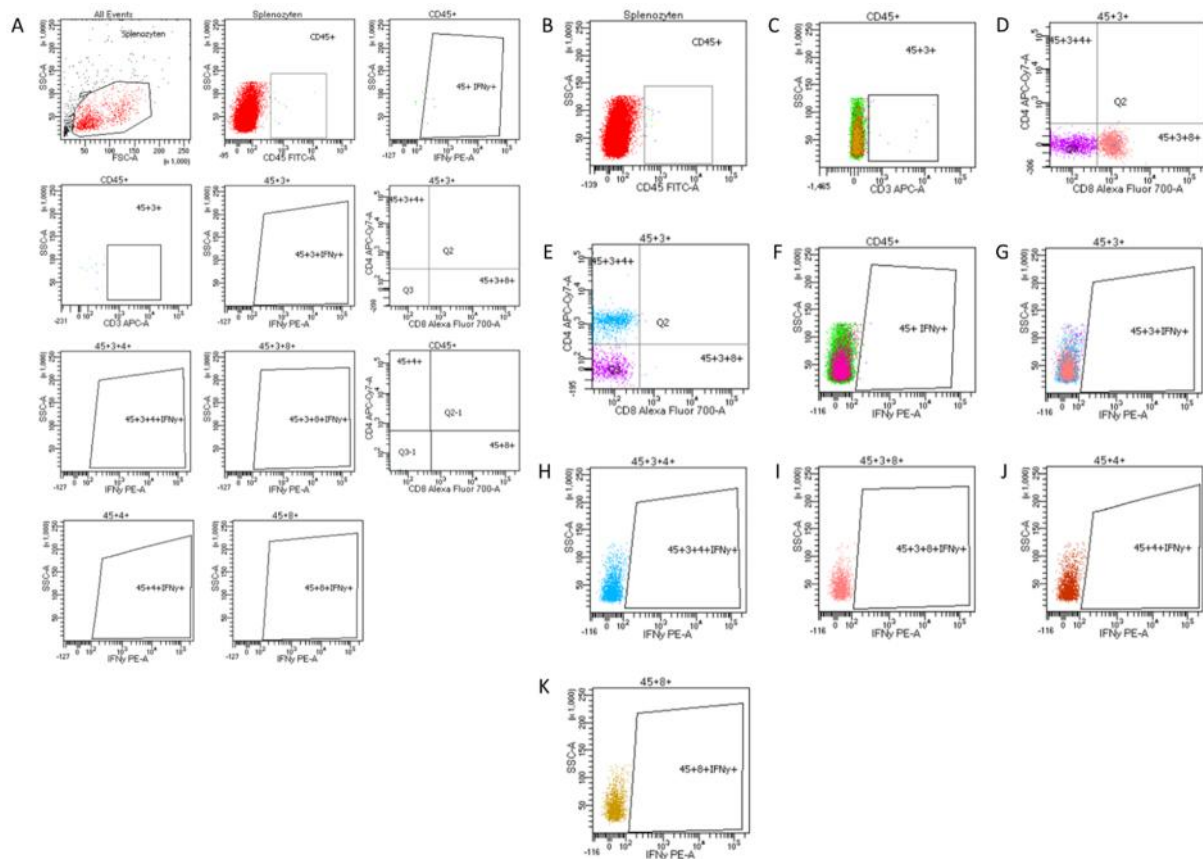


Abbildung 14: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des IFN γ -Panels

[A]: ungefärbte Kontrolle FACS-Bild Dotplots **[B]:** FMO für CD45 FACS-Bild Dotplot **[C]:** FMO für CD3 FACS-Bild Dotplot **[D]:** FMO für CD4 FACS-Bild Dotplot **[E]:** FMO für CD8 FACS-Bild Dotplot **[F]:** FMO für IFN γ aus CD45⁺ FACS-Bild Histogramm **[G]:** FMO für IFN γ aus CD45⁺CD3⁺ FACS-Bild Dotplot **[H]:** FMO für IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ FACS-Bild Dotplot **[I]:** FMO für IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ FACS-Bild Dotplot **[J]:** FMO für IFN γ aus CD45⁺CD4⁺ FACS-Bild Dotplot **[K]:** FMO für IFN γ aus CD45⁺CD8⁺ FACS-Bild Dotplot

5.1.6 Panel der Zytokinbehandlung

In noch unveröffentlichten Studien zur Expression von CD73 auf Splenozyten in Kultur nach Inkubation mit Zellkulturüberstand der Linie Panc02, wurde gezeigt, dass die CD73-Expression sich erhöhte. In jener Arbeit ergab die Zytokinmessung im Panc02-Überstand diverse Zytokine in verschiedenen Konzentrationen. Überprüft wurde daraufhin von den Autoren die Inkubation von Splenozyten in Kultur mit TGF- β , wobei sich herausstellte, dass dieses Zytokin nicht für die Steigerung der CD73-Expression verantwortlich war.

Deshalb haben wir in dieser Arbeit die mengenmäßig nach TGF- β vier meisten Zytokine aus dem Zellkulturüberstand von Panc02 untersucht. Dies waren IL-13, IL-17A, IFN γ und VEGF. Zusätzlich wurde als Kombinationsbehandlung noch IL-13 mit TGF- β angewandt. Die CD73-

5.1.6.2 Unstained und FMOs

Für alle verwendeten Antikörper wurden bei jeder Messung FMOs (Abb. 16B-F) durchgeführt und zusätzlich eine ungefärbte Kontrolle (Abb. 16A). Für den Antikörper CD73 ergaben sich somit drei FACS-Bilder in der FMO, da dieser bekanntlich aus den CD4⁺ T-Zellen (Abb. 16G), den CD8⁺-T-Zellen (Abb. 16H) und den B-Lymphozyten (Abb. 16I) ermittelt wurde.

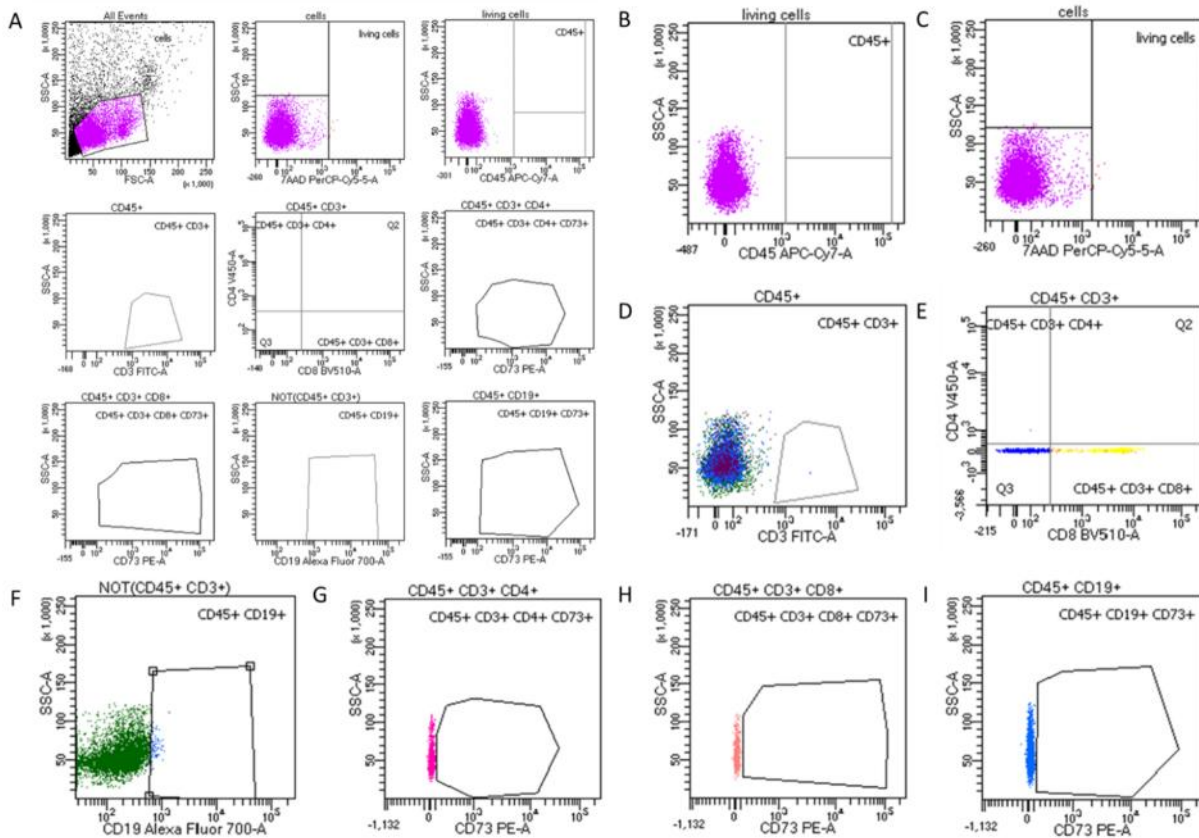


Abbildung 16: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des CD73-Panels

[A]: ungefärbte Kontrolle Dotplots FACS-Bild **[B]:** FMO für CD45 aus allen lebenden Zellen Dotplot FACS-Bild **[C]:** FMO für 7AAD aus allen Zellen Dotplot FACS-Bild **[D]:** FMO für CD3 aus CD45⁺ Zellen Dotplot FACS-Bild **[E]:** FMO für CD4 aus CD45⁺CD3⁺ Zellen Dotplot FACS-Bild **[F]:** FMO für CD19 aus CD45⁺CD3⁻ Zellen Dotplot FACS-Bild **[G]:** FMO für CD73 aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen Dotplot FACS-Bild **[H]:** FMO für CD73 aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺Zellen Dotplot FACS-Bild **[I]:** FMO für CD73 aus CD45⁺CD3⁻CD19⁺ Zellen Dotplot FACS-Bild

5.2 Immunophänotypisierung

5.2.1 CD73KO-Mäuse zeigen mehr CD4⁺ T_{effector}-Zellen und T_{con}, jedoch weniger aktivierte T_{con} und T_{reg}

5.2.1.1 T-Lymphozyten

Zunächst wurde der prozentuale Anteil der CD3⁺ T-Lymphozyten an den CD45⁺ Leukozyten verglichen, welche wiederum wie in Abbildung 5A zu sehen aus den per SSC und FSC definierten lebenden Zellen identifiziert wurden. Bei der statistischen Auswertung (Abb.

17A) ergab sich zwar kein statistisch signifikanter Unterschied bei C57BL/6 und CD73KO-Mäusen, jedoch zeichnet sich mit einem p-Wert von 0,094 eine Tendenz ab, dass in CD73KO-Mäusen weniger CD3⁺ T-Lymphozyten in der Milz vorhanden sind als bei Mäusen des Wildtyps.

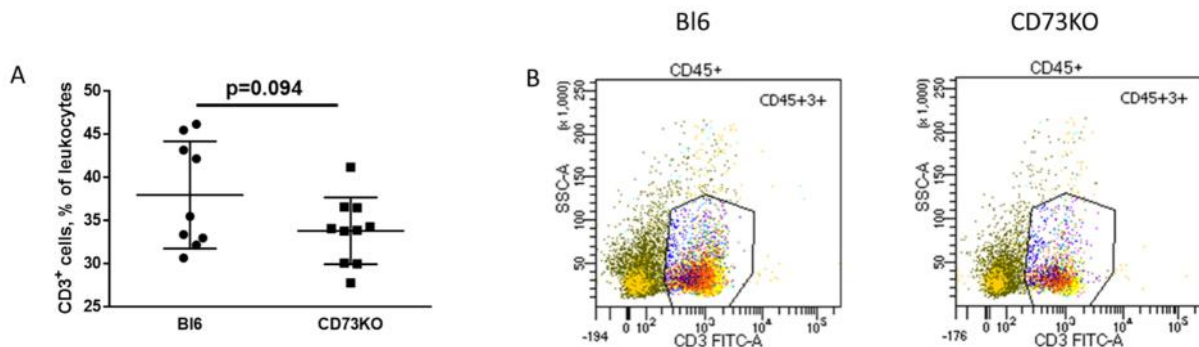


Abbildung 17: CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten in der Immunphänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD3⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,098 **[B]:** CD3 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO

5.2.1.1.1 CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen

Im nächsten Schritt wurde aus den zuvor identifizierten T-Lymphozyten der prozentuale Anteil an CD4⁺ T-Zellen an jenen identifiziert (Abb. 18B). Hier konnte zwischen den beiden Maustypen kein Unterschied der prozentualen Anteile in Bezug zu den CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten festgestellt werden (Abb. 18A). Deshalb wurde im folgenden Schritt der prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Zellen an CD45⁺ Leukozyten ermittelt (Abb. 18D). Bei der statistischen Auswertung dieser Ergebnisse (Abb. 18C) ergab sich auch hier, mit einem p-Wert von 0,089, die Tendenz, dass CD73KO-Mäuse geringere Werte aufweisen. Um die Subpopulationen dieser T-Zellen zu identifizieren wurden die Oberflächenmarker CD44 und CD62L im Dotplot gegenübergestellt (Abb. 18H). Hierbei wurden die naiven T-Zellen als CD44⁻CD62L⁺, die Memory-T-Zellen als CD44⁺CD62L⁻ und Effektor-T-Zellen als CD44⁻CD62L⁻ definiert. Hierbei zeigte sich, dass CD73KO-Mäuse prozentual tendenziell (p=0,085) weniger T_{memory}-Zellen (Abb. 18G), aber einen signifikant höheren Anteil an T_{effector}-Zellen aufweisen (Abb. 18F). Bei den naiven T-Zellen zeigte sich jedoch kein Unterschied (Abb. 18E).

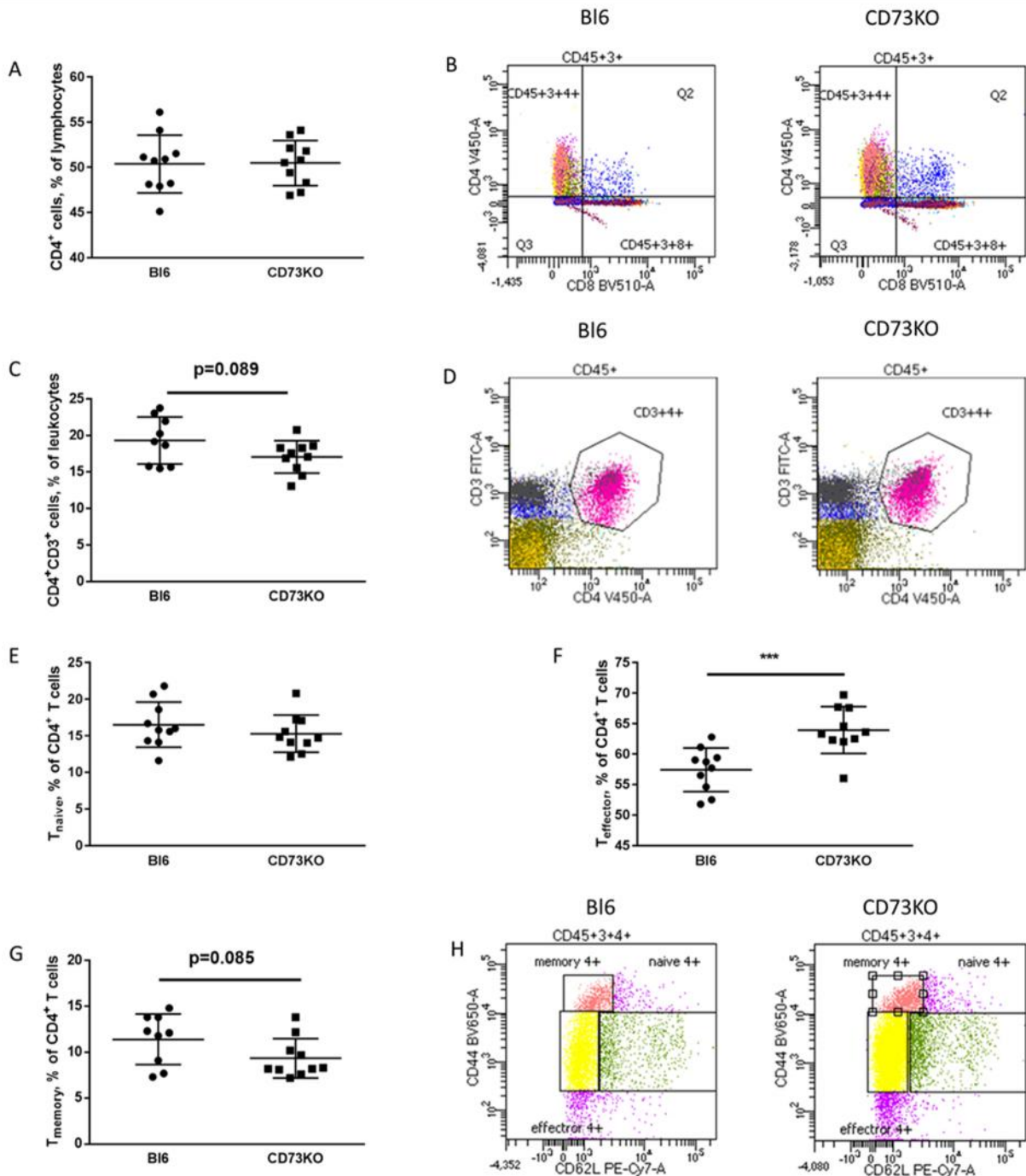


Abbildung 18: CD45⁺CD3⁺CD4⁺ T-Zellen in der Immunphänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD4⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** CD4 aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[C]:** % von CD3⁺CD4⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,089 **[D]:** CD3 vs. CD4 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[E]:** % von CD62L⁺CD44⁻ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** % von CD62⁺CD44⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p<0,001 **[G]:** % von CD62⁺CD44⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,085 **[H]:** CD62L vs. CD44 aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO

5.2.1.1.2 T_{reg} , T_{con} und aktivierte T_{con}

Bereits in den Dotplot FACS-Bildern ließ sich eine deutliche Verschiebung innerhalb der drei Subpopulationen im Vergleich der beiden Mausstämme Wildtyp und CD73KO erkennen (Abb. 19D). Bei der statistischen Auswertung bestätigte sich dieses Bild sehr deutlich, dass CD73KO-Mäuse signifikant mehr T_{con} -Zellen aufweisen (Abb. 19A), jedoch aber gleichzeitig signifikant weniger aktivierte T_{con} -Zellen (Abb. 19C). Besonders auffällig war der Unterschied bei den T_{reg} -Zellen, bei denen sich in CD73KO-Mäusen mit hoher Signifikanz weniger dieser Zellen zeigten (Abb. 19B).

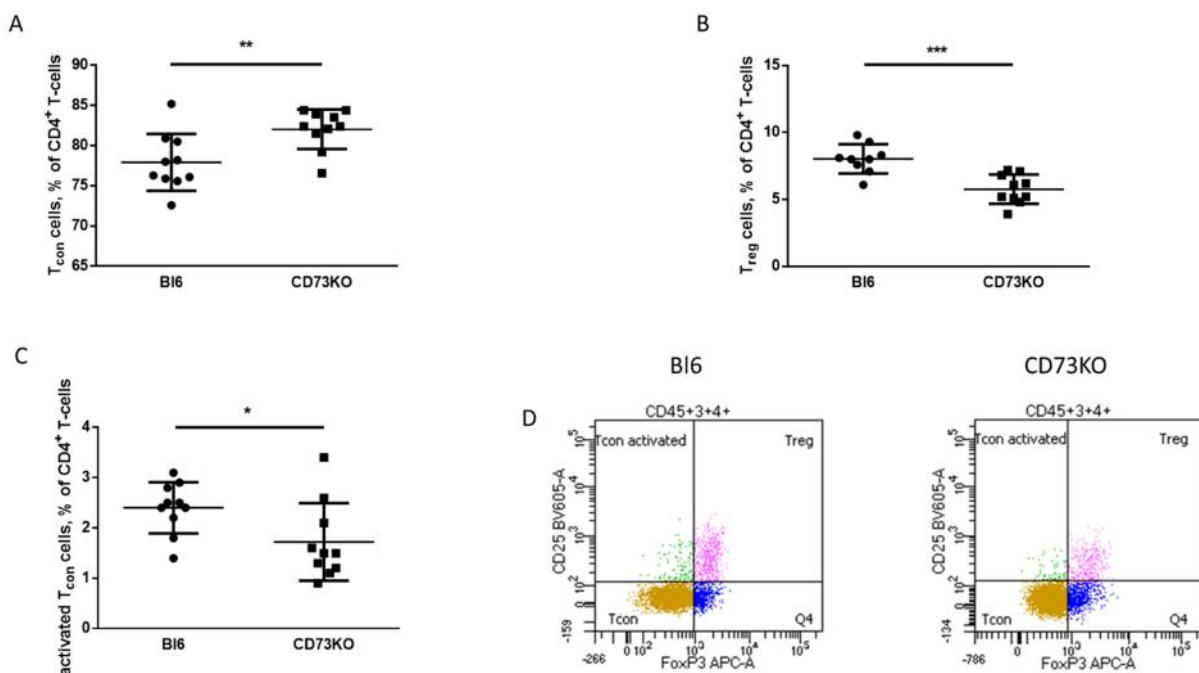


Abbildung 19: T_{reg} und (aktivierte) T_{con} in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD25-FoxP3- Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$ **[B]:** % von CD25⁺FoxP3⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,001$ **[C]:** % von CD25⁺FoxP3- Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,05$ **[D]:** CD25 vs. FoxP3 aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO

5.2.1.1.3 CD8⁺ T-Zellen und Subpopulationen

Die weitere sichtbare Population bei der Gegenüberstellung von CD4 und CD8 aus den CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten sind die CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten. Bei diesen wurde analog zu der Vorgehensweise bei den CD4⁺ T-Zellen zunächst der Anteil der CD8⁺ Zellen an den CD45⁺CD3⁺ Zellen (Abb. 20B) und anschließend der Anteil der CD8⁺ Zellen an den CD45⁺ Zellen (Abb. 20D) ermittelt und statistisch verglichen (Abb. 20A und C). In beiden Fällen

konnten keine Unterschiede der prozentualen Anteile festgestellt werden. Auch bei den CD8⁺-T-Zellen wurden die Subpopulation durch die Gegenüberstellung von CD44 und CD62L identifiziert (Abb. 20H). Bei der statistischen Auswertung der prozentualen Anteile der Subpopulationen CD44⁻CD62L⁺ T_{naive} (Abb. 20E), CD44⁺CD62L⁻ T_{memory} (Abb. 20G) und CD44⁺CD62L⁻ T_{effector} (Abb. 20F) an den CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Zellen konnten keinerlei Unterschiede zwischen Mäusen der Gattungen C57BL/6 und CD73KO festgestellt werden.

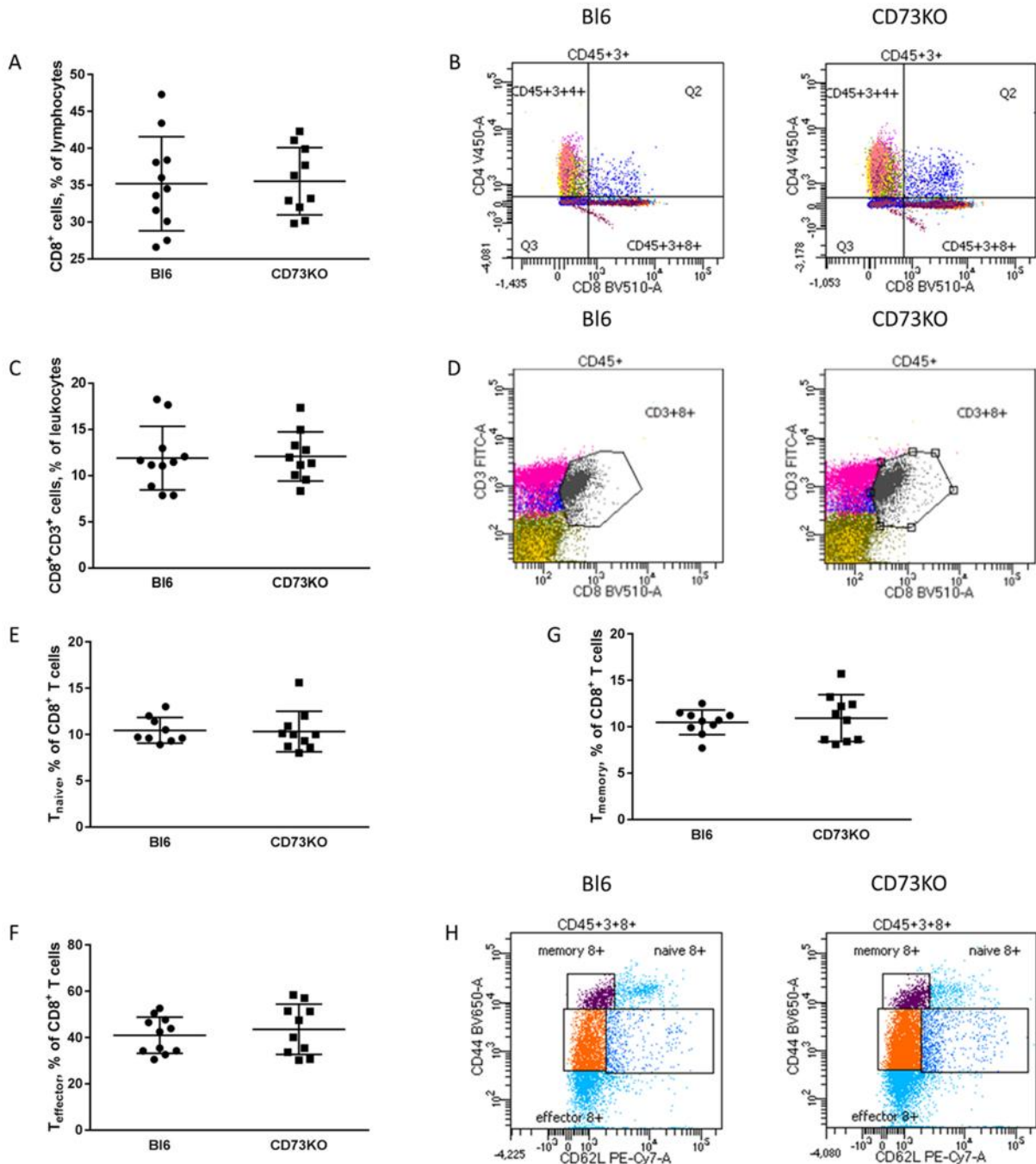


Abbildung 20: CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD8⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** CD8 aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[C]:** % von CD3⁺CD8⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** CD3 vs. CD8 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[E]:** % von CD62L⁺CD44⁻ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** % von CD62-CD44⁻ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[G]:** % von CD62-CD44⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[H]:** CD62L vs. CD44 aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO

5.2.1.1.4 Ratio von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen

Ebenfalls interessant war es zu betrachten, ob sich das Verhältnis der CD45⁺CD3⁺CD4⁺ T-Helfer-Zellen zu den CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Zellen durch einen Knockout von CD73 verschiebt. Eine derartige Verschiebung der T-Zellpopulationen untereinander zeigte sich jedoch nicht (Abb. 21A).

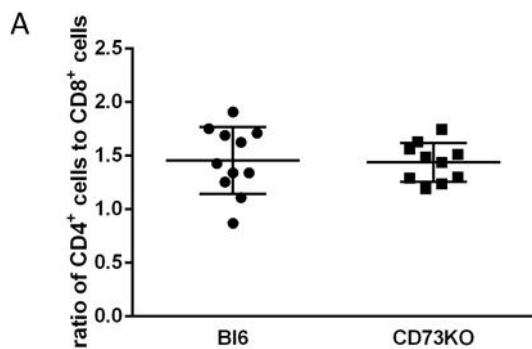


Abbildung 21: Ratio von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.2.1.1.5 NKT Zellen

Eine weitere wichtige Subpopulation der T-Lymphozyten sind die NKT-Zellen, die sich durch die Expression des Oberflächenmarkers NK1.1 auszeichnen. Hierzu wurde Nk1.1 mit CD69 als Marker für Aktivierung eben jener NKT-Zellen gegenübergestellt (Abb. 22B) und aus den CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten identifiziert. Bei den inaktivierten CD69⁻ NKT-Zellen ergab sich nach statistischer Auswertung kein Unterschied bei den Mäusen Wildtyp und CD73KO (Abb. 22A). Bei den aktivierten CD69⁺ NKT-Zellen wurde zunächst ihr prozentualer Anteil an den CD45⁺CD3⁺ Zellen verglichen (Abb. 22C), wobei sich kein Unterschied zeigte. Zusätzlich wurde die MFI der aktivierten NKT-Zellen betrachtet. So kann man im Gegensatz zu der

Prozentangabe, bei der man die Menge der positiven Zellen darstellt, die Stärke der Expression des Oberflächenmarkers auf den einzelnen Zellen nachweisen. Hierbei ergab sich ebenfalls kein Unterschied in der statistischen Auswertung (Abb. 22D)

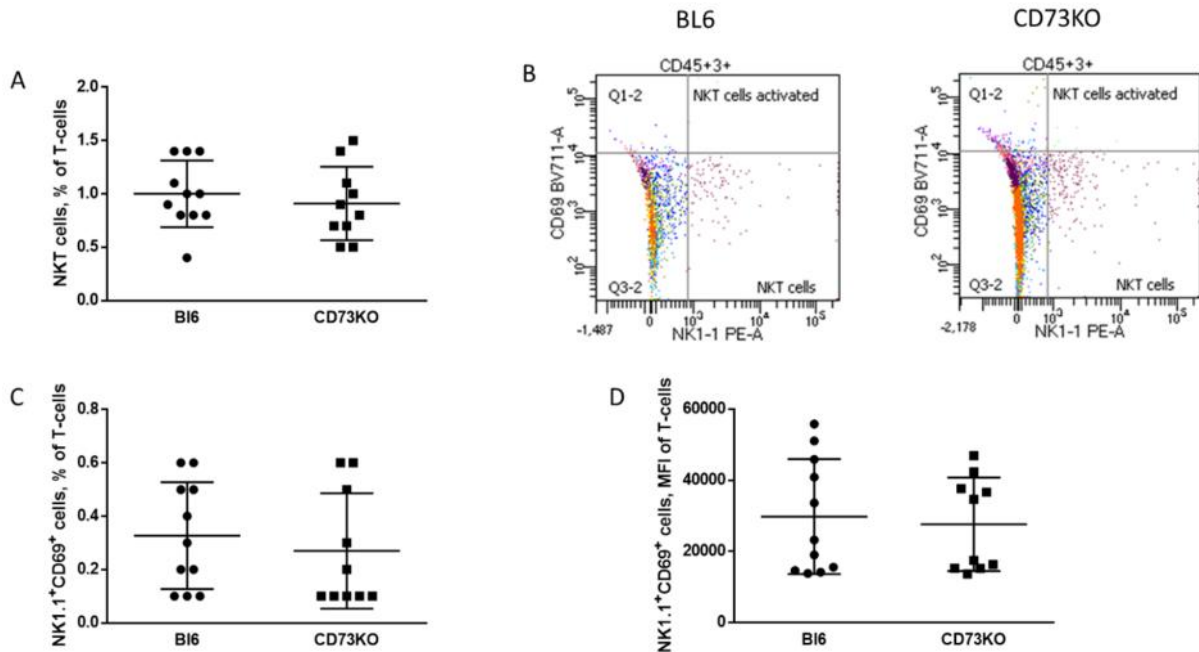


Abbildung 22: CD45⁺CD3⁺NK1.1⁺ NKT-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von NK1.1⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** NK1.1 vs. CD69 aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[C]:** % von NK1.1⁺CD69⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** MFI von NK1.1⁺CD69⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.2.2 CD73KO-Mäuse zeigen tendenziell mehr B-Lymphozyten

Bei der Messung der CD45⁺CD3⁻CD19⁺ B-Lymphozyten konnte man sowohl im Vergleich der Dotplot FACS-Bilder (Abb. 23B) als auch in der statistischen Auswertung der prozentualen Anteile an den CD45⁺ Leukozyten (Abb. 23A) eine Tendenz (p=0,078) erkennen, dass bei CD73KO-Mäusen mehr B-Lymphozyten in der Milz präsent sind, als bei den C57BL/6 Mäusen.

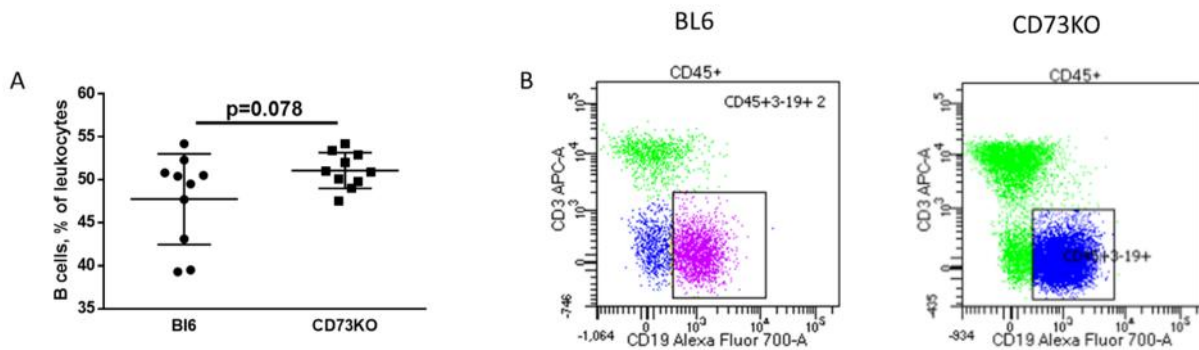


Abbildung 23: CD45⁺CD3⁻CD19⁺ B-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD3⁻CD19⁺ Zellen aus CD45 Zellen C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p=0,078$ **[B]:** CD3 vs. CD19 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO

5.2.3 CD73KO-Mäuse zeigen weniger NK-Zellen und auch weniger aktivierte NK-Zellen

Bei den NK-Zellen wurde analog zu den NKT-Zellen CD69 als Aktivierungsmarker mit NK1.1, hier jedoch aus den CD45⁺CD3⁻ Zellen, gegenübergestellt (Abb. 24B). Bei der statistischen Auswertung der NK1.1⁺ Zellen aus den CD45⁺CD3⁻ Zellen war der prozentuale Anteil bei CD73KO-Mäusen signifikant niedriger als bei den Mäusen des Wildtyps (Abb. 24A). Derselbe signifikante Unterschied zeigte sich bei den Prozent der aktivierten NK-Zellen aus den CD45⁺CD3⁻ Zellen (Abb. 24C). Die Intensität der Strahlkraft gemessen mit MFI und somit die Stärke der Expression unterschied sich bei den beiden Mausstämmen jedoch nicht (Abb. 24D)

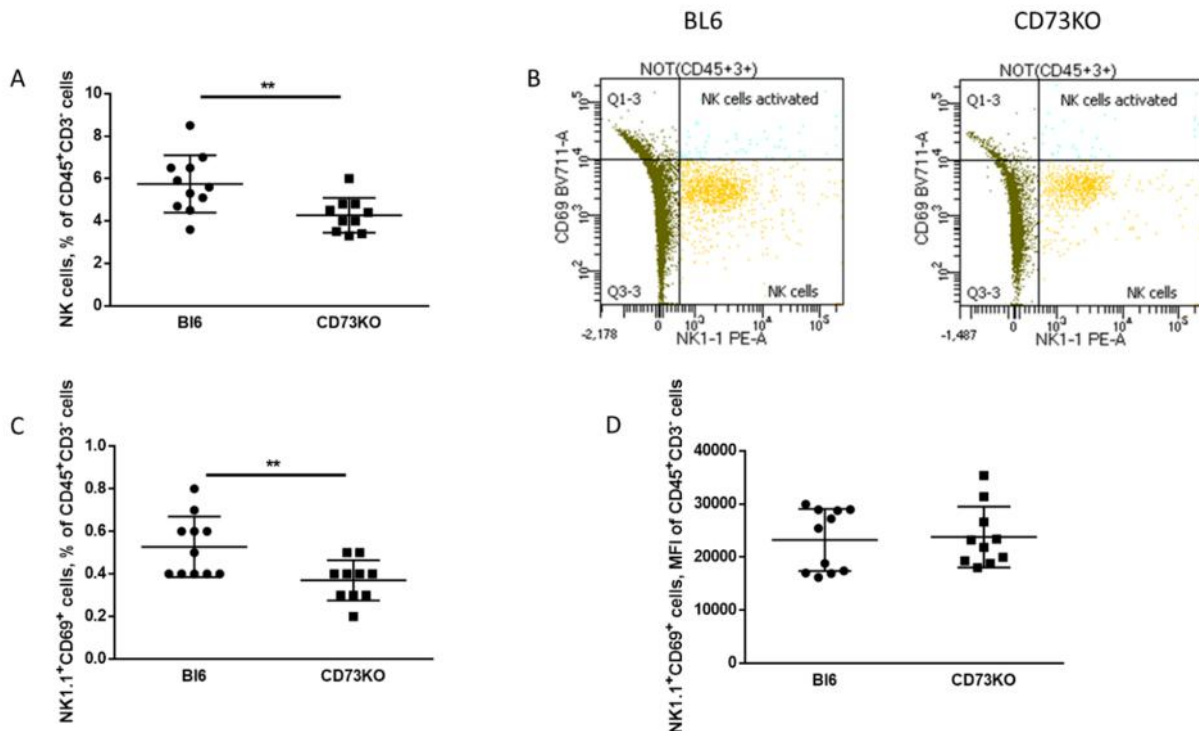


Abbildung 24: CD45⁺CD3⁻NK1.1⁺ NK-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

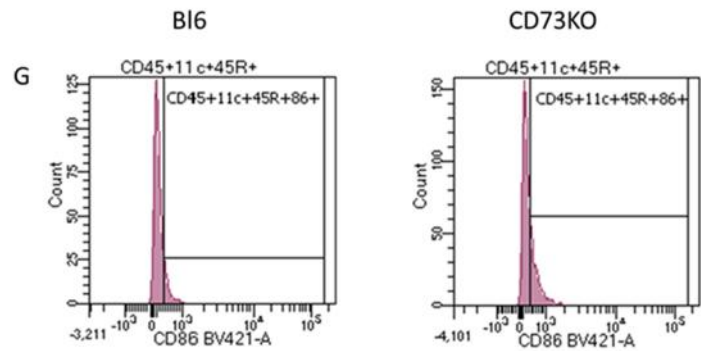
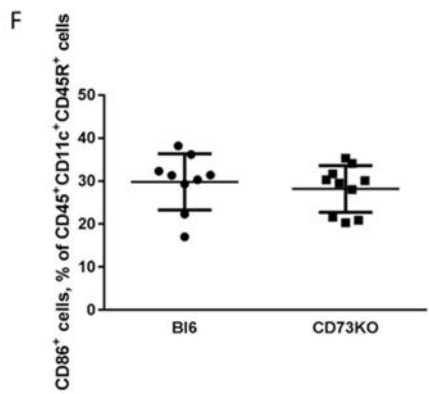
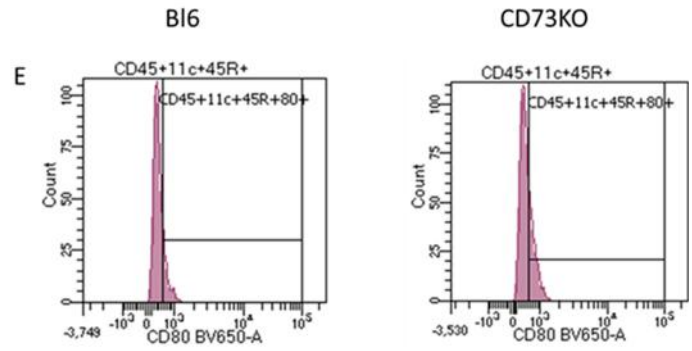
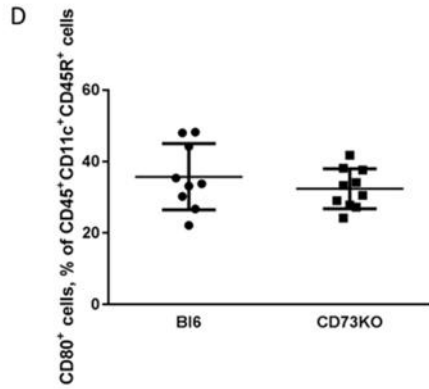
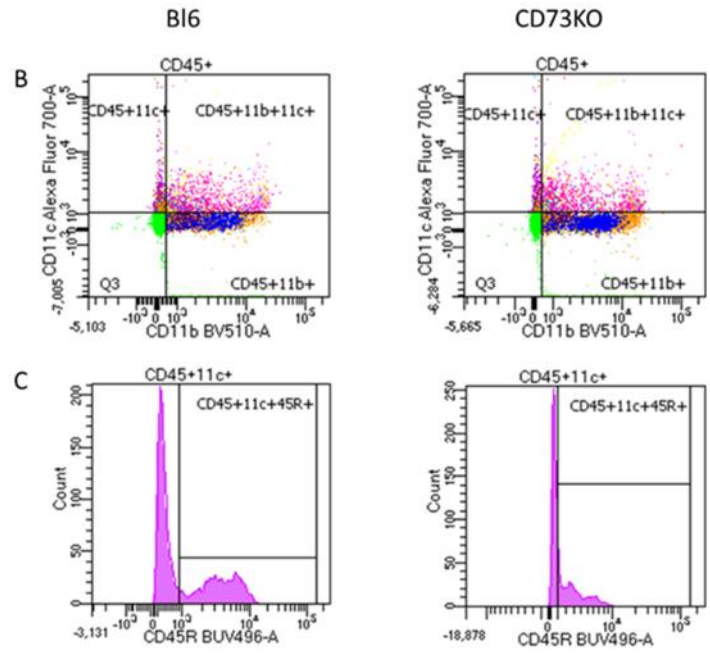
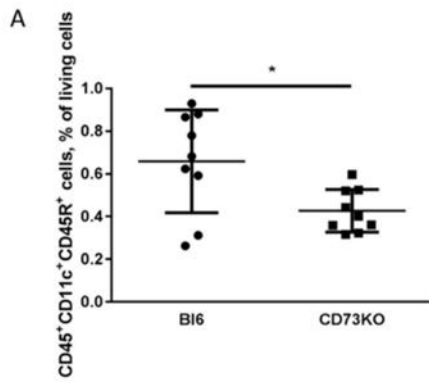
[A]: % von NK1.1⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁻ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$ [B]: NK1.1 vs. CD69 aus CD45⁺CD3⁻ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO [C]: % von NK1.1⁺CD69⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁻ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$ [D]: MFI von NK1.1⁺CD69⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁻ Zellen, C57BL/6 (n=11) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.2.4 CD73KO-Mäuse zeigen weniger pDC, geringere CD86 Aktivierung der pDC und vermehrte CD80 und CD86 Aktivierung der cDC

5.2.4.1 pDCs inklusive Aktivierung mit CD80 und CD86

Zunächst wurden die pDCs untersucht, die sich von den cDCs durch ein Fehlen des Oberflächenmarker CD11b unterscheiden, aber zusätzlich CD45R exprimieren. Im FACS Dotplot wurde aus den CD11b⁻CD11c⁺ Zellen (Abb. 25B) im Histogramm die Population der zusätzlich CD45R positiven (Abb. 25C) pDCs quantifiziert. Bei der statistischen Auswertung (Abb. 25A) der prozentualen Anteile an allen lebenden Zellen zeigten CD73KO-Mäuse signifikant weniger pDCs als die Mäuse des Wildtyps. Des Weiteren wurden die pDCs auf die Ausprägung der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 (Abb. 25E) und CD86 (Abb. 25G) und deren doppelte Expression (Abb. 25I) hin untersucht. Diese Moleküle dienen der T-Zell-Aktivierung und werden zeitlich unterschiedlich exprimiert. Bei der statistischen Auswertung des früheren, initial exprimierten CD86 (Abb. 25F), des später exprimierten

CD80 (Abb. 25D) und der doppelten Expression beider Moleküle (Abb. 25H) ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Maustypen. Deshalb wurde zusätzlich die MFI beider Aktivierungsmarker untersucht, um herauszufinden ob die einzelnen Zellen dieser Moleküle vermehrt exprimieren. Bei CD80 war dies nicht der Fall (Abb. 25J), jedoch zeigten sich bei CD86 (Abb. 25K) signifikant niedrigere Werte bei CD73KO-Mäusen.



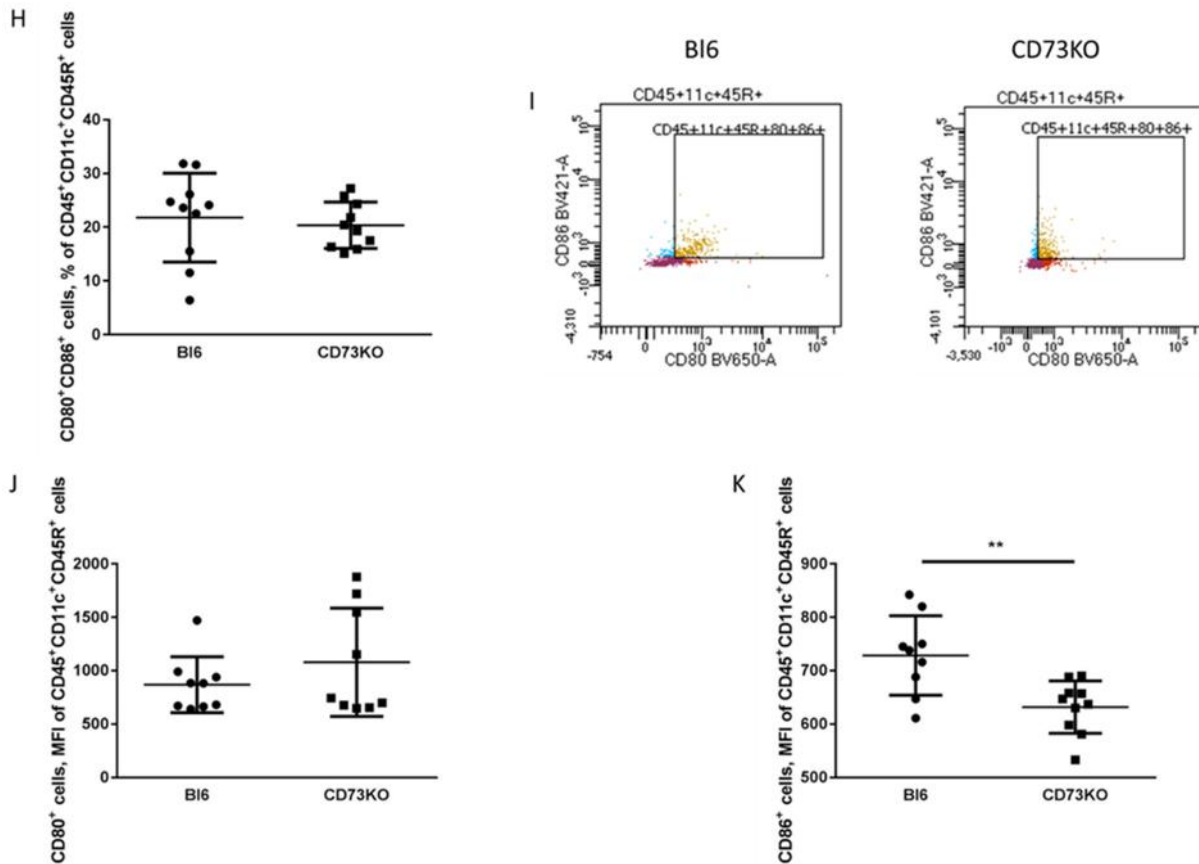


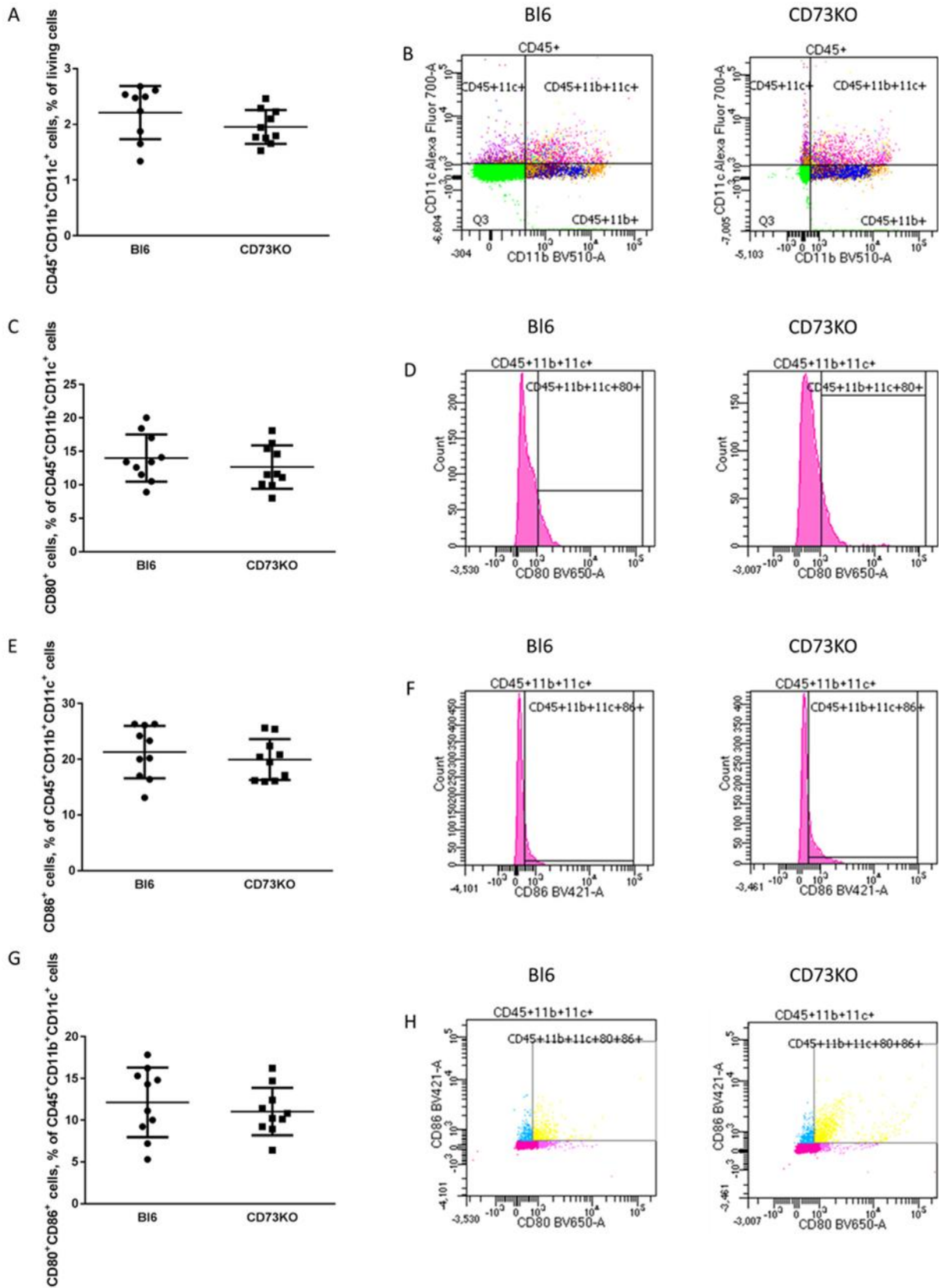
Abbildung 25: CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ pDC in der Immunphänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen aus allen lebenden Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,05$ [B]: CD11c vs. CD11b aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO [C]: CD45R aus CD45⁺CD11c⁺ Zellen, repräsentative Histogramm FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO [D]: % von CD80⁺ Zellen aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [E]: CD80 aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen, repräsentative Histogramm FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO [F]: % von CD86⁺ Zellen aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [G]: CD86 aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen, repräsentative FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO [H]: % von CD80⁺CD86⁺ Zellen aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [I]: CD86 vs. CD80 aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO [J]: MFI von CD80⁺ Zellen aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [K]: MFI von CD86⁺ Zellen aus CD45⁺CD11c⁺CD45R⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$

5.2.4.2 cDCs inklusive Aktivierung mit CD80 und CD86

Im nächsten Schritt wurden die CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ cDCs identifiziert (Abb 26B). Bei der statistischen Auswertung der prozentualen Anteile dieser Population an allen lebenden Zellen zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen (Abb. 26A). Auch bei den cDCs wurden die Anteile der mit CD80 (Abb. 26D), CD86 (Abb. 26F) und der doppelt, also CD80 und CD86 (Abb. 26H), aktivierten Zellen ermittelt. Bei der statistischen Auswertung (Abb. 26C, E und G) zeigte sich bei keiner dieser drei Populationen

ein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Bei der zusätzlichen Auswertung der MFI konnten wiederum für beide Aktivierungsmarker statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die einzelnen cDCs der CD73KO-Mäuse exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl mehr CD80 (Abb. 26I) als auch CD86 (Abb. 26J) im Vergleich zu Mäusen des Wildtyps.



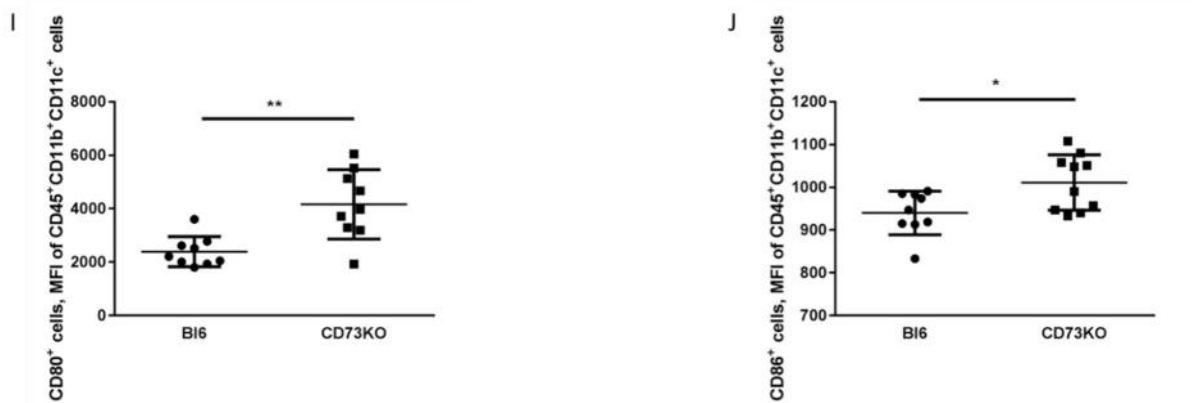


Abbildung 26: CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ cDC in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen aus allen lebenden Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** CD11c vs. CD11b aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[C]:** % von CD80⁺ Zellen aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** CD80 aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, repräsentative Histogramm FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[E]:** % von CD86⁺ Zellen aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** CD86 aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, repräsentative Histogramm FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[G]:** % von CD80⁺CD86⁺ Zellen aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[H]:** CD80 vs. CD86 aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO **[I]:** MFI von CD80⁺ Zellen aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p<0,01 **[J]:** MFI von CD86⁺ Zellen aus CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p<0,05

5.2.5 CD73KO-Mäuse zeigen keine Veränderungen der Anzahl der MDSC und Makrophagen

5.2.5.1 MDSC

Eine weitere sehr wichtige Zellfraktion der Immunzellen sind die MDSCs. Besonders im Hinblick auf die Immunonkologie spielen diese Zellen durch ihre immunsupprimierende Fähigkeit eine äußerst interessante Rolle. Es existieren zwei Hauptgruppen der MDSCs, eingeteilt und benannt nach ihrem Ursprung. Die PMN-MDSC, definiert als CD45⁺CD11b⁺Ly6-G⁺Ly6-C^{low} und die M-MDSC, definiert als CD45⁺CD11b⁺Ly6-G⁻Ly6-C^{high} (Abb. 27C). Bei der statistischen Auswertung beider MDSC-Populationen zeigte sich weder bei den PMN-MDSC (Abb. 27A) noch bei den M-MDSC (Abb. 27B) Unterschiede der prozentualen Anteile an den Leukozyten.

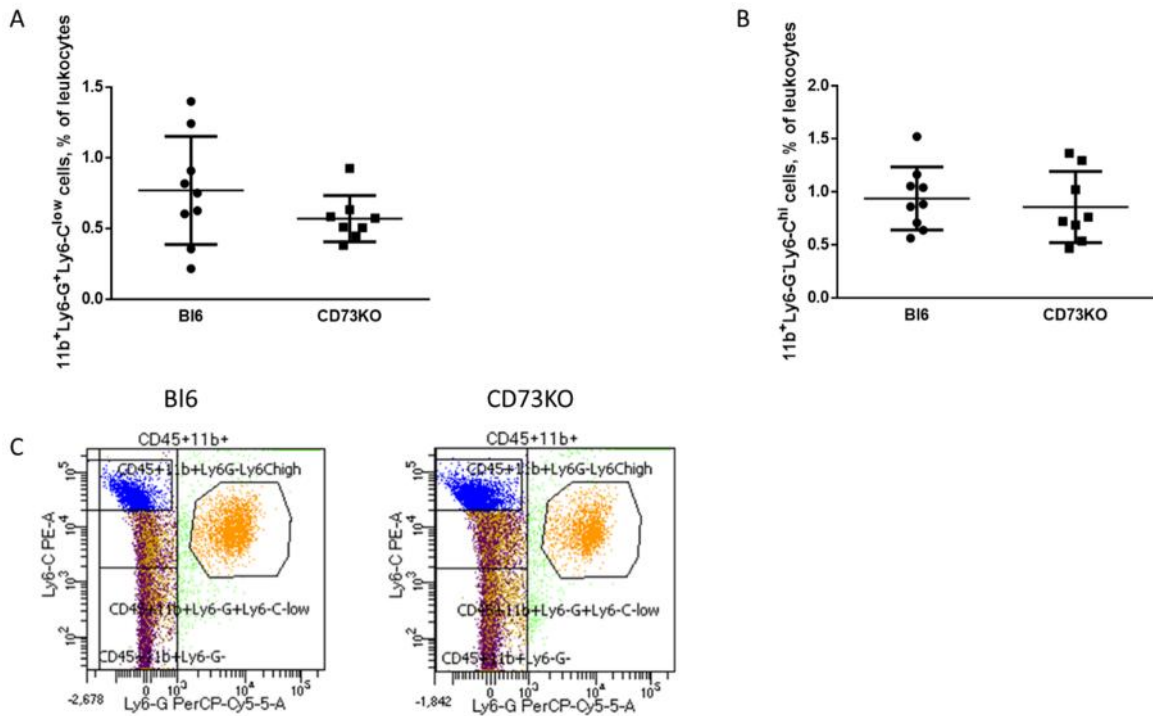


Abbildung 27: MDSC in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von CD11b⁺Ly6-G⁺Ly6-C^{low} Zellen aus CD45⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % von CD11b⁺Ly6-G-Ly6-C^{high} Zellen aus CD45⁺ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** Ly6-C vs. Ly6-G aus CD45⁺CD11b⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO

5.2.5.2 Makrophagen

Zuallerletzt wurden der prozentuale Anteil der Makrophagen an den Leukozyten betrachtet, welche als CD45⁺CD11b⁺Ly6-G⁻F4/80⁺ Zellen im Histogramm (Abb. 28B) identifiziert wurden. Bei der statistischen Auswertung der prozentualen Anteile der Makrophagen an den Leukozyten ergaben sich keine Unterschiede zwischen Mäusen des Wildtyps und Knockout-Mäusen (Abb. 28A).

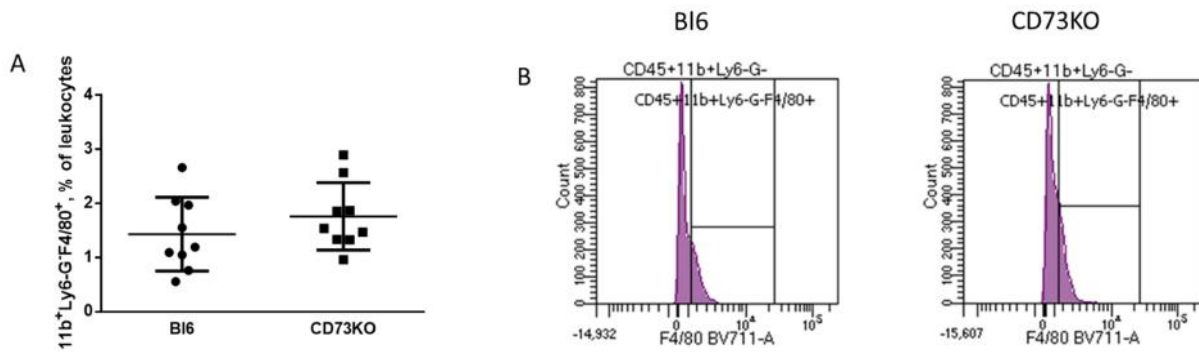


Abbildung 28: Makrophagen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen

[A]: % von $CD11b^+Ly6-G-F4/80^+$ Zellen aus $CD45^+$ Zellen, C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** F4/80 aus $CD45^+CD11b^+Ly6-G^-$ Zellen, repräsentative Histogramm FACS-Bilder von C57BL/6 vs. CD73KO

5.2.6 CD73KO-Mäuse zeigen weniger IL-6 im Serum

Ergänzend zur durchflusszytometrischen Immunophänotypisierung von C57BL/6 und CD73KO-Mäusen wurde von diesen die Konzentration von neun ausgewählten Zytokinen im Serum mittels BioPlex-Assay bestimmt. Gemessen wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, TNF- α und IFN γ , das antiinflammatorische Zytokin IL-10, das sowohl anti- als auch proinflammatorisch wirkende IL-13 und das an der Neoangiogenese beteiligte Zytokin VEGF. Bei der statistischen Auswertung dieser Konzentrationen konnte im Falle von IL-1 β (Abb. 29A), IL-2 (Abb. 29I), IL-10 (Abb. 29G), IL-13 (Abb. 29F), IL-17 (Abb. 29E), IFN γ (Abb. 29B) und VEGF (Abb. 29C) kein Unterschied festgestellt werden. Bei der Konzentration von TNF- α zeichnete sich jedoch eine Tendenz ab (Abb. 29D), dass CD73KO-Mäuse eine höhere Konzentration als Mäuse des Wildtyps aufweisen. Bei der Auswertung der IL-6-Konzentrationen (Abb. 29H) im Serum hingegen zeigten CD73KO-Mäuse signifikant geringere Werte auf als die Wildtypmäuse.

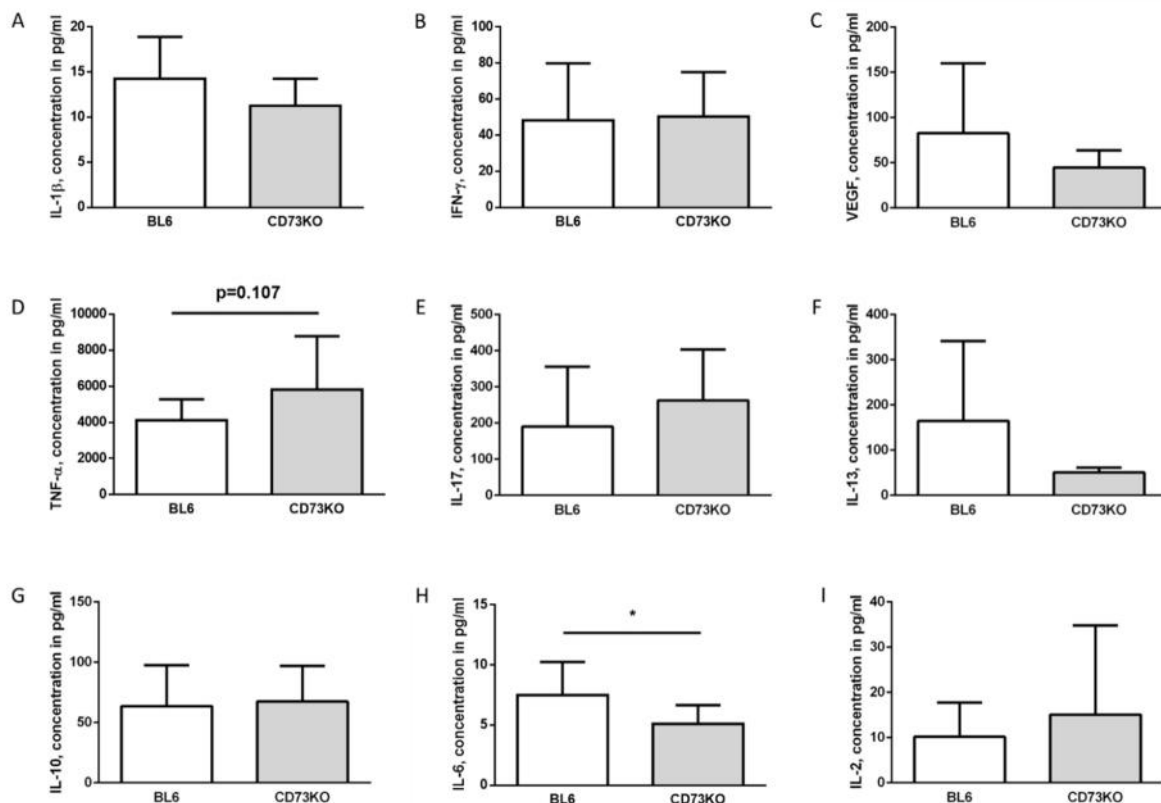


Abbildung 29: Quantifizierung ausgewählter Zytokine im Serum von gesunden Mäusen mittels BioPlex

[A]: Konzentration von IL-1 β in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=4) vs. CD73KO (n=4), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** Konzentration von IFN γ in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** Konzentration von VEGF in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** Konzentration von TNF- α in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,1066 **[E]:** Konzentration von IL-17 in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** Konzentration von IL-13 in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=3) vs. CD73KO (n=4), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[G]:** Konzentration von IL-10 in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=10) vs. CD73KO (n=10), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[H]:** Konzentration von IL-6 in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p<0,05 **[I]:** Konzentration von IL-2 in pg/ml im Serum von C57BL/6 (n=7) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.3 Tumorimplantation

5.3.1 CD73KO-Mäuse bilden weniger und kleinere Tumoren

Bei der orthotopen Tumordinjektion wurden je Maus 100.000 Zellen der Zelllinie Panc02 in 5 μ l PBS nach Eröffnung des Abdomens in einen Pankreasschenkel injiziert. Hierbei sollte das Tumorstadium in einem Zeitraum von 30 Tagen bei C57BL/6 und CD73KO-Mäusen im Vergleich untersucht werden. Schon bei der ersten Operation wurde deutlich, dass sich bei nicht allen CD73KO-Mäusen nach dieser Zeit ein Primärtumor im Pankreas gebildet hatte, bzw. in Remission gegangen ist, wohingegen bei ausnahmslos allen C57BL/6-Mäusen

Tumoren vorzufinden waren. Einige dieser Mäuse mussten sogar vorzeitig aus Tierschutzgründen getötet werden, da diese bereits derartig unter den Folgen der Tumorbildung litten. Diese Mäuse wurden aufgrund der nicht vergleichbaren Dauer des Experiments aus der Auswertung ausgeschlossen. Als Ziel wurde gesetzt, eine ähnliche Anzahl und mindestens zehn tumortragende Mäuse beider Gruppen für die späteren Messungen zu erhalten, weshalb bei den weiteren Operationen stets mehr CD73KO-Mäuse als C57BL/6, jedoch mindestens drei dieser, eingesetzt wurden. Dies führte dazu, dass letzten Endes 24 CD73KO-Mäuse und 12 C57BL/6-Mäuse in die Auswertung einfließen.

5.3.1.1 Tumorbildung nach 30 Tagen

Wie eingangs erwähnt, zeigte sich bei allen 12 Mäusen des Wildtyps nach 30 Tagen ein deutlicher Primärtumor im Pankreas, wohingegen nur 10 der 24 operierten CD73KO-Mäuse in dem festgelegten Zeitraum von 30 Tagen einen makroskopisch sichtbaren Primärtumor im Pankreas bildeten. Dies stellte sich auch in der statistischen Auswertung mit sehr hoher Signifikanz dar (Abb. 30A).

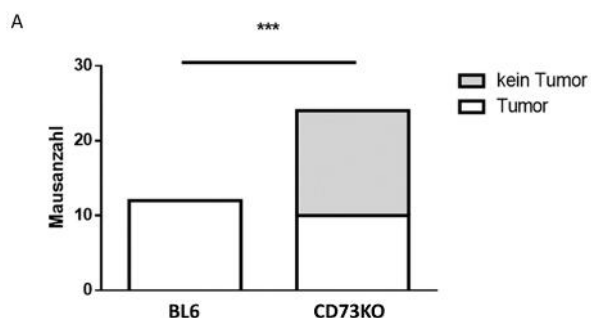


Abbildung 30: Tumorbildung 30 Tage nach orthotoper Injektion von Panc02

[A]: Anzahl der Mäuse mit Tumorbildung im Pankreas 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen, C57BL/6 (n=12) vs. CD73KO (n=24), dargestellt als stacked bars, Chi-Quadrat-Test $p < 0,001$

5.3.1.2 Tumolvolumen nach 30 Tagen

Außerdem war es sehr interessant zu betrachten, wie sich im beschriebenen Zeitraum die volumenmäßige Ausprägung bei den tumortragenden Mäusen unterschied. Bei der statistischen Auswertung wurde sehr deutlich, dass CD73KO-Mäuse signifikant geringere Volumina der Primärtumoren im Pankreas aufweisen (Abb. 31A).

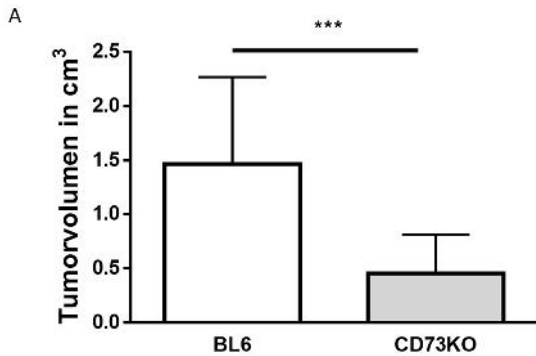


Abbildung 31: Tumorzellen 30 Tage nach orthotoper Injektion von Panc02

[A]: Anzahl der Mäuse mit Tumorbildung im Pankreas 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen, C57BL/6 (n=12) vs. CD73KO (n=24), dargestellt als stacked bars, Mann-Whitney-Test $p < 0,001$

5.3.2 FACS-Messungen

5.3.2.1 Tumortragende CD73KO-Mäuse zeigen weniger T-Lymphozyten in der Milz auf als nicht tumortragende und in Milzen befinden sich generell mehr T-Lymphozyten als in Tumoren

Zunächst wurde betrachtet, ob sich bei der Anzahl der T-Lymphozyten zwischen den einzelnen Mausgruppen Unterschiede feststellen lassen.

5.3.2.1.1 Tumor

Als erstes wurden die $CD3^+$ T-Lymphozyten aus den $CD45^+$ Leukozyten in Tumoreinzelsuspensionen von Wildtypmäusen und CD73KO-Mäusen im FACS-Dotplot verglichen (Abb. 32B). Bei der statistischen Auswertung (Abb. 32A) ergaben sich hierbei keine Unterschiede bei den beiden Mausgruppen.

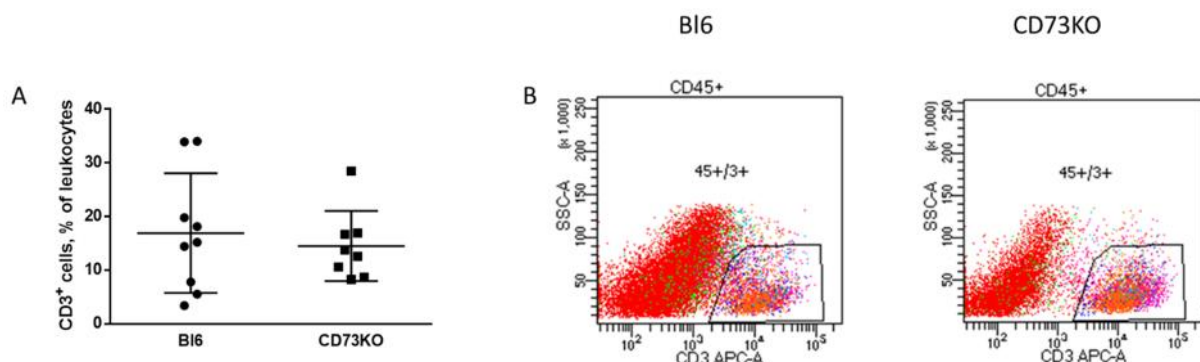


Abbildung 32: Quantifizierung der $CD45^+CD3^+$ T-Lymphozyten in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von $CD3^+$ Zellen aus $CD45^+$ Zellen im Primärtumor von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** $CD3$ aus $CD45^+$ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Primärtumor von C57BL/6 vs. CD73KO

5.3.2.1.2 Milzen von tumortragenden Mäusen

Im nächsten Schritt wurden die selbigen Zellen auf die gleiche Art aus den Milzeinzelsuspensionen von tumortragenden Mäusen beider Gruppen identifiziert und verglichen (Abb. 33B). Auch hier konnten bei der statistischen Auswertung keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 33A)

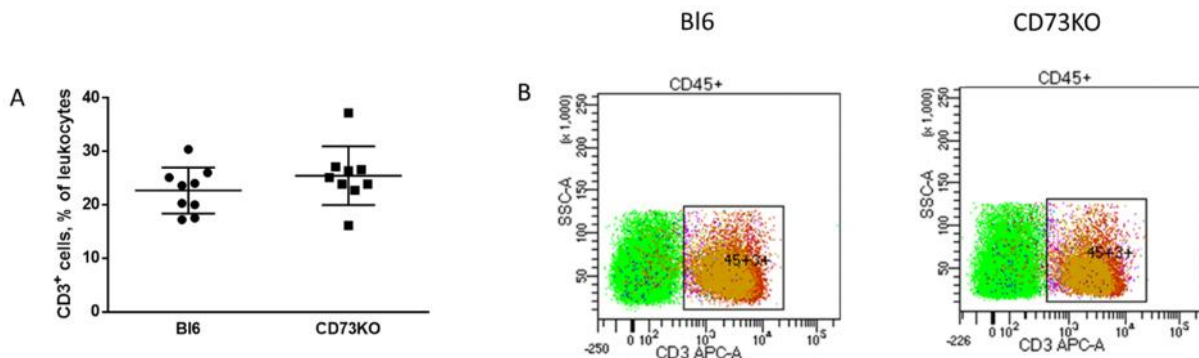


Abbildung 33: Quantifizierung der CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD3⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** CD3 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. CD73KO

5.3.2.1.3 Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO

Im weiteren Verlauf wurden die Milzeinzelsuspensionen von nicht tumortragenden CD73KO-Mäusen (CD73KO-) mit denen der tumortragenden CD73KO-Mäuse (CD73KO+) auf die gleiche Art wie zuvor verglichen (Abb. 34B). Hier zeigte sich bei der statistischen Auswertung (Abb. 34A), dass tumortragende CD73KO-Mäuse signifikant weniger CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten in der Milz aufweisen als nicht tumortragende CD73KO-Mäuse.

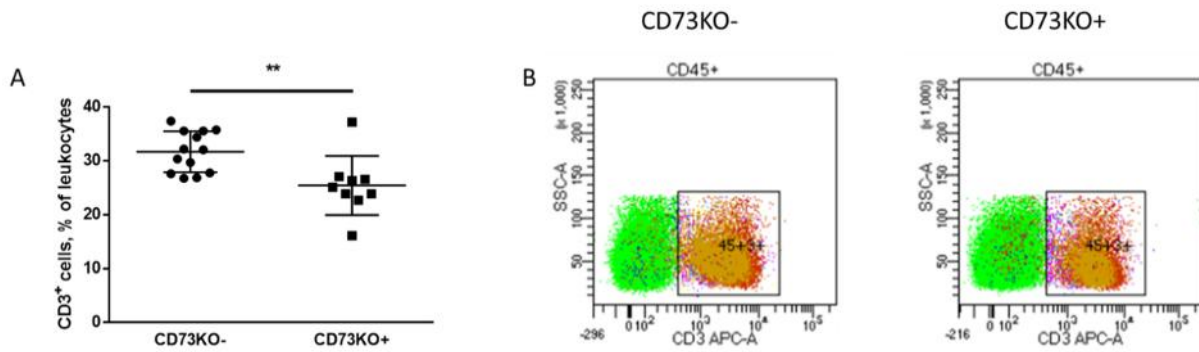


Abbildung 34: Quantifizierung der CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD3⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden (n=9) und nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$ **[B]:** CD3 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden CD73KO

5.3.2.1.4 Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren

Schließlich wurde noch betrachtet ob sich generell mehr T-Lymphozyten in den Tumor- oder in den Milzeinzelsuspensionen nachweisen lassen. Hierzu wurden die Werte aus den Tumoren und aus den Milzen von tumortragenden Mäusen der Wildtyp- und CD73KO-Mäuse zusammengenommen und untereinander verglichen. Schon im FACS-Dotplot (Abb. 35B) ließ sich ebenso wie in der statistischen Auswertung (Abb. 35A) leicht erkennen, dass in Milzen signifikant mehr T-Lymphozyten vorhanden sind als in Tumoren.

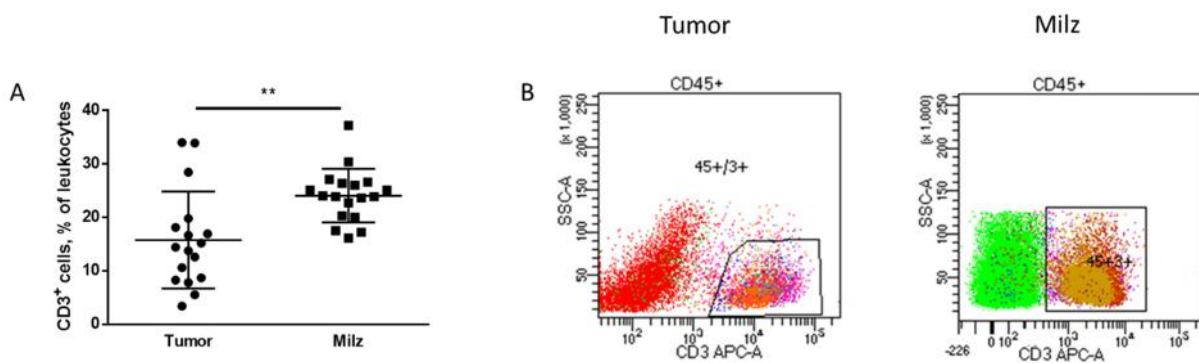


Abbildung 35: Quantifizierung der CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD3⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen (n=18) von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren (n=17), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$ **[B]:** CD3 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren

5.3.2.2 CD73KO-Mäuse zeigen keine Veränderungen bei den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus den CD45⁺3⁺Zellen

Im folgenden Schritt wurde, analog zur Messung der T-Lymphozyten im Punkt zuvor, die prozentuale Menge der CD4⁺ T-Zellen und der CD8⁺ T-Zellen an den CD45⁺CD3⁺ T-Lymphozyten ermittelt.

5.3.2.2.1 Tumor

Wie zuvor wurden zunächst Tumoreinzelsuspensionen von Wildtyp- und CD73KO-Mäusen im FACS-Dotplot verglichen (Abb. 36C). Sowohl bei der statistischen Auswertung der CD4⁺ T-Zellen (Abb. 36A) als auch bei den CD8⁺-T-Zellen (Abb. 36B) zeigten sich hierbei keinerlei Unterschiede.

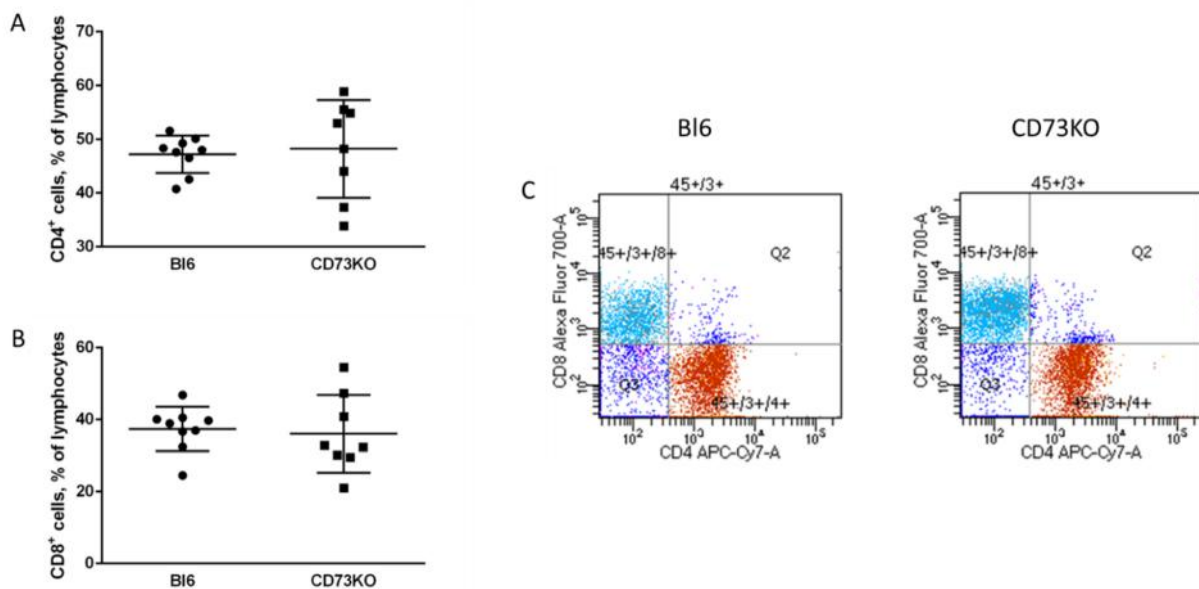


Abbildung 36: Quantifizierung der CD45⁺CD3⁺CD4⁺ und CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD4⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen im Primärtumor von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % von CD8⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen im Primärtumor von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** CD4 vs. CD8 aus CD45⁺CD3⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Primärtumoren von C57BL/6 vs. CD73KO

5.3.2.2.2 Milzen von tumortragenden Mäusen

In diesem Schritt wurden die CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen in Milzsuspensionen von C57BL/6 und Knockout-Mäusen wie oben beschrieben verglichen (Abb. 37C). Bei der statistischen Auswertung dieser (Abb. 37A und B) kam es zu keinen Unterschieden.

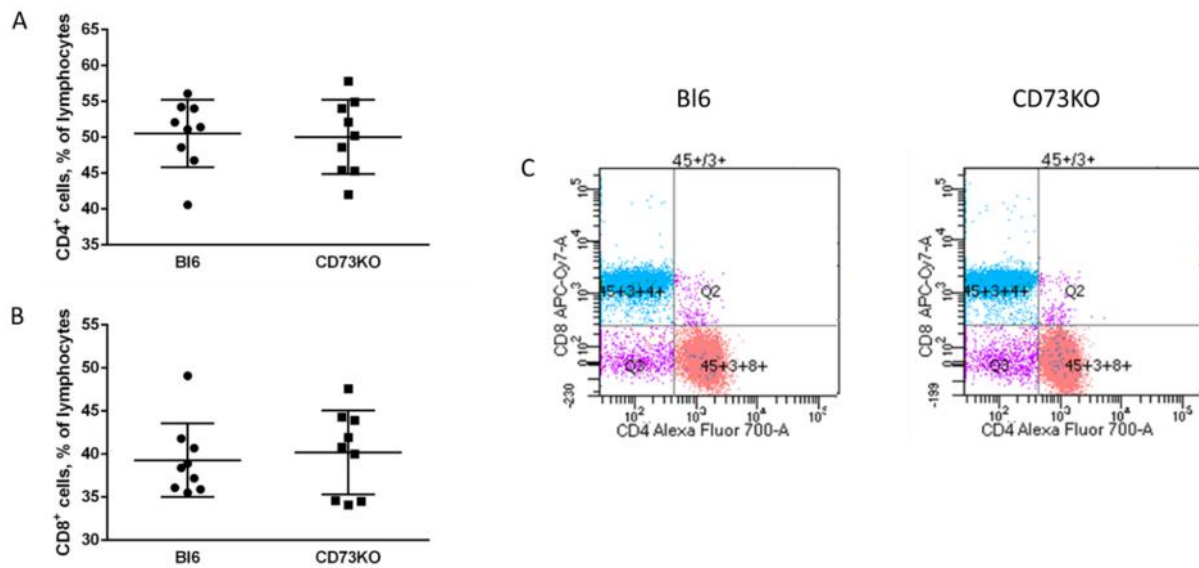


Abbildung 37 Quantifizierung der $CD45^+CD3^+CD4^+$ und $CD45^+CD3^+CD8^+$ T-Lymphozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von $CD4^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 ($n=9$) vs. CD73KO ($n=9$), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % von $CD8^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 ($n=9$) vs. CD73KO ($n=9$), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** CD4 vs. CD8 aus $CD45^+CD3^+$ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. CD73KO

5.3.2.2.3 Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO

Anschließend wurden auch hier die Milzen von nicht tumortragenden und tumortragenden CD73KO-Mäusen verglichen (Abb. 38C). Bei der statistischen Auswertung waren auch hier keine signifikanten Unterschiede messbar (Abb. 38A und B)

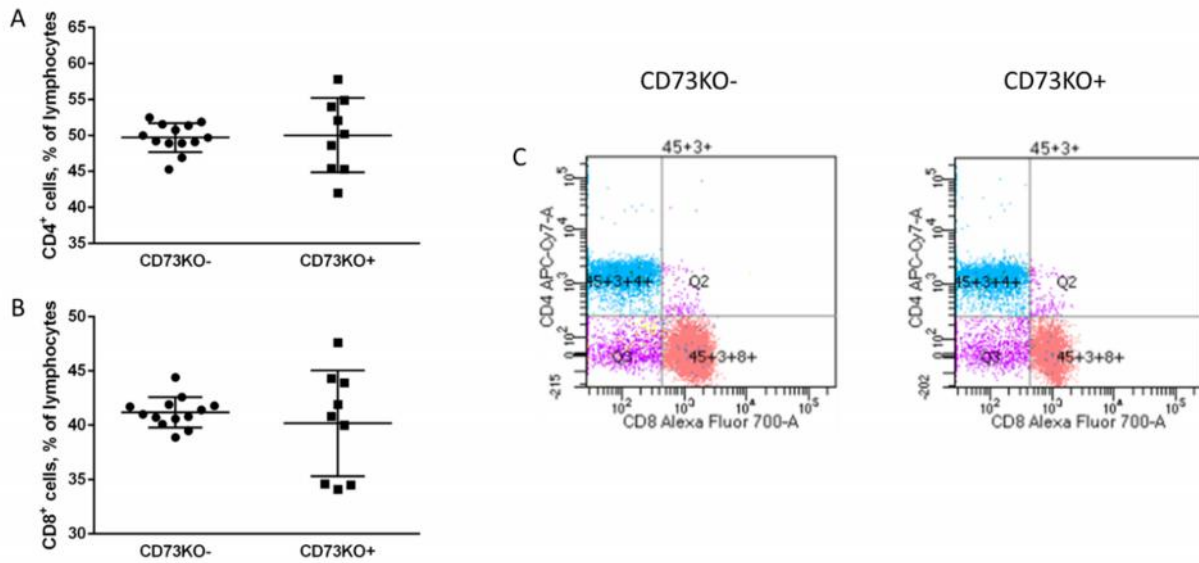


Abbildung 38: Quantifizierung der $CD45^+CD3^+CD4^+$ und $CD45^+CD3^+CD8^+$ T-Lymphozyten in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von $CD4^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden ($n=9$) vs. nicht tumortragenden ($n=13$) $CD73KO$, dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % von $CD8^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ in Milzen von tumortragenden ($n=9$) vs. nicht tumortragenden ($n=13$) $CD73KO$, dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** $CD4$ vs. $CD8$ aus $CD45^+CD3^+$ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden $CD73KO$

5.3.2.2.4 Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren

Letztlich wurden analog zum vorherigen Vorgehen noch die Tumoren und Milzen beider Mausgruppen je zusammengefasst und verglichen (Abb. 39C). Dabei zeigten sich bei der statistischen Auswertung, anders als zuvor bei den T-Lymphozyten, sowohl bei $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 39A) als auch bei den $CD8^+$ -T-Zellen (Abb. 39B) ähnliche Mengen in Tumoren und Milzen.

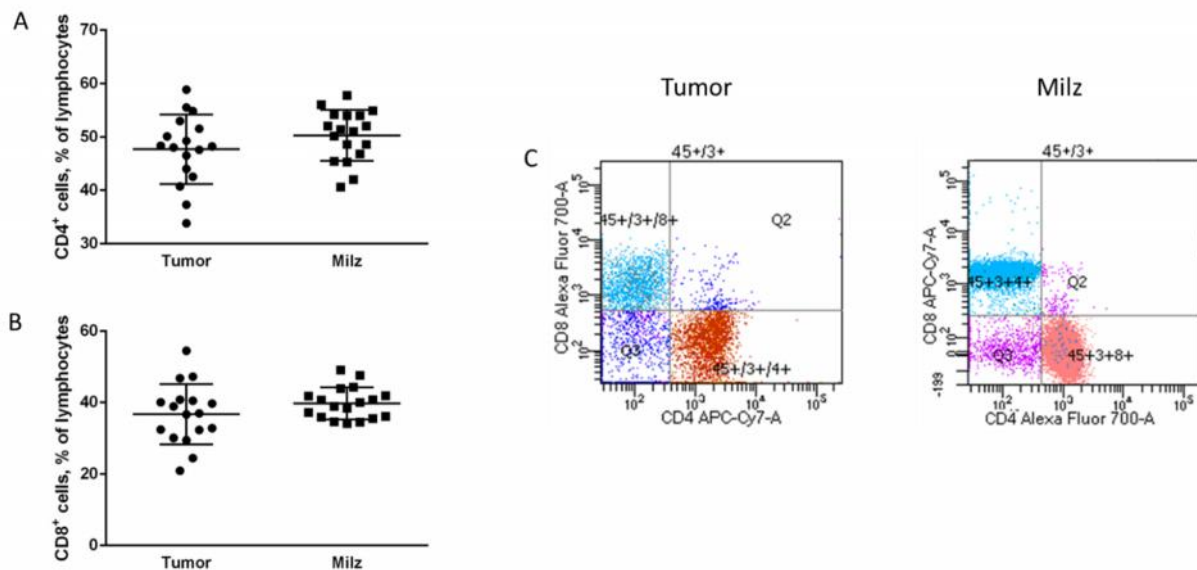


Abbildung 39: Quantifizierung der $CD45^+CD3^+CD4^+$ und $CD45^+CD3^+CD8^+$ T-Lymphozyten in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von $CD4^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden Mäusen ($n=18$) vs. Tumor ($n=17$), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % von $CD8^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden Mäusen ($n=18$) vs. Tumor ($n=17$), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** $CD4$ vs. $CD8$ aus $CD45^+CD3^+$ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren

5.3.2.3 Tumortragende $CD73^{KO}$ -Mäuse zeigen weniger $CD3^+CD4^+$ und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen aus den $CD45^+$ Zellen in den Milzen als nicht tumortragende und in Milzen sind generell mehr dieser Zellen als in Tumoren

Da sich im vorherigen Punkt bei der Identifizierung der $CD4^+$ T-Zellen und der $CD8^+$ -T-Zellen aus den $CD45^+CD3^+$ T-Lymphozyten lediglich eine Verteilung dieser Zellen unter den T-Lymphozyten ablesen lässt, wurden bei diesen Zellarten zusätzlich der prozentuale Anteil der $CD3^+CD4^+$ Zellen und der $CD3^+CD8^+$ Zellen an den $CD45^+$ Leukozyten identifiziert und analog zum vorherigen Vorgehen quantifiziert.

5.3.2.3.1 Tumor

Beim FACS-Dotplot-Vergleich der $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 40C) und der $CD8^+$ -T-Zellen (Abb. 40D) aus Tumoreinzelsuspensionen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen, zeigten sich auch bei der Identifizierung aus den Leukozyten in der statistischen Auswertung (Abb. 40A und B) keine Unterschiede.

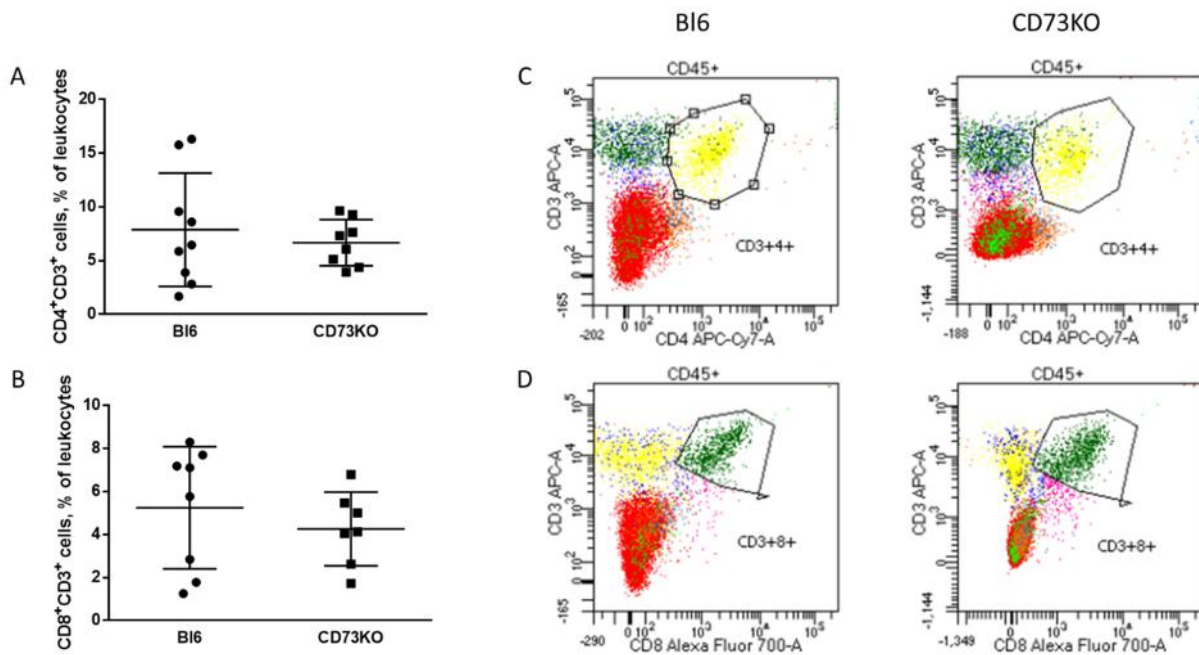


Abbildung 40: Quantifizierung der CD45⁺CD3⁺CD4⁺ und CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten aus CD45⁺ Leukozyten in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD4⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen im Primärtumor von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % von CD8⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen im Primärtumor von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** CD3 vs. CD4 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Primärtumor von C57BL/6 vs. CD73KO **[D]:** CD3 vs. CD8 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Primärtumor von C57BL/6 vs. CD73KO

5.3.2.3.2 Milzen von tumortragenden Mäusen

Bei analogem Vorgehen bei Milzeinzelsuspensionen von Wildtyp- und Knockoutmäusen (Abb. 41C und D) zeigten sich in der statistischen Auswertung (Abb. 41A und B) dieser Werte ebenfalls keine Unterschiede.

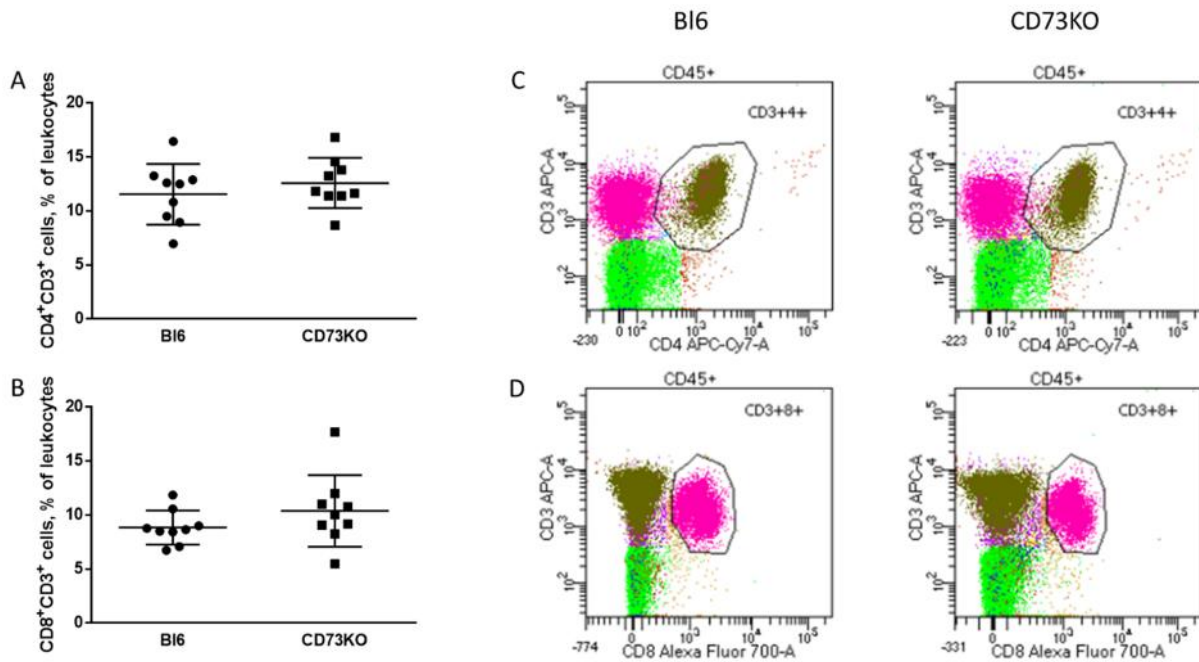


Abbildung 41: Quantifizierung der CD45⁺CD3⁺CD4⁺ und CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten aus CD45⁺ Leukozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD4⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % von CD8⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** CD3 vs. CD4 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. CD73KO **[D]:** CD3 vs. CD8 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. CD73KO

5.3.2.3.3 Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO

Beim Vergleich der Milzsuspensionen von tumortragenden mit den nicht tumortragenden CD73KO-Mäusen (Abb. 42 C und D) zeigten tumortragende Mäuse signifikant weniger CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus den CD45⁺ Leukozyten (Abb. 42 A und B).

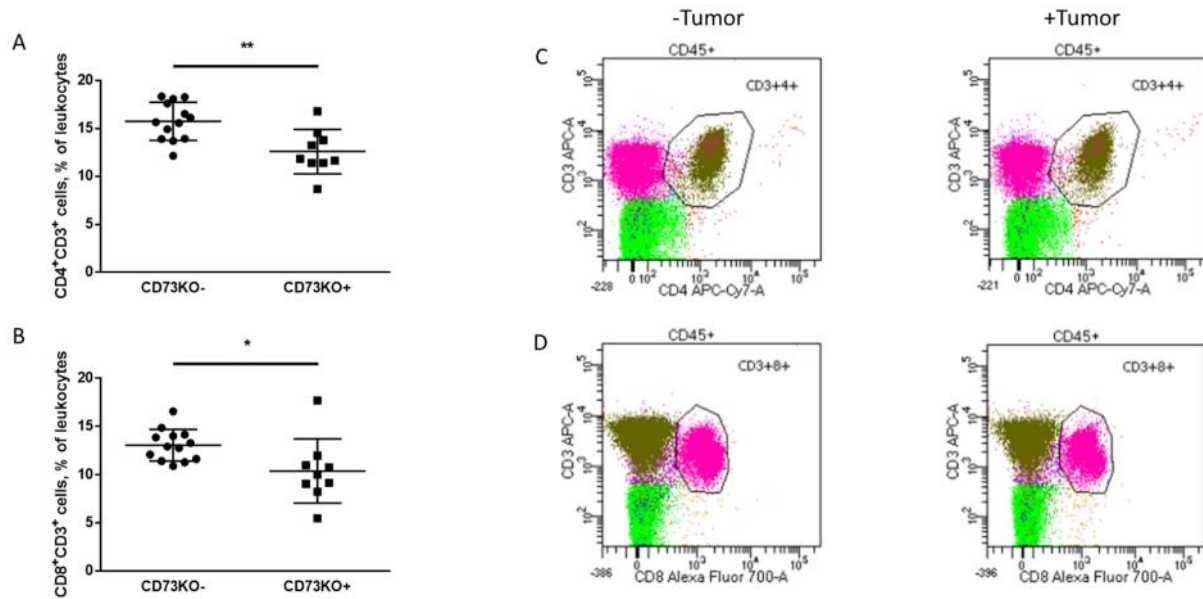


Abbildung 42: Quantifizierung der CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten aus CD45⁺ Leukozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD4⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$ **[B]:** % von CD8⁺ Zellen aus CD45⁺ in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,05$ **[C]:** CD3 vs. CD4 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO **[D]:** CD3 vs. CD8 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO

5.3.2.3.4 Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren

Letztlich wurden wie zuvor noch alle Werte aus den Milzen mit denen aus den Tumoren verglichen (Abb. 43C und D). Hier zeigte sich der Vorteil der alternativen Identifizierung der T-Zell-Subpopulationen aus den CD45⁺ Leukozyten, denn bei der statistischen Auswertung (Abb. 43A und B) wurde deutlich, dass in den Milzen sowohl mehr CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺-T-Zellen vorhanden sind als in den Tumoren.

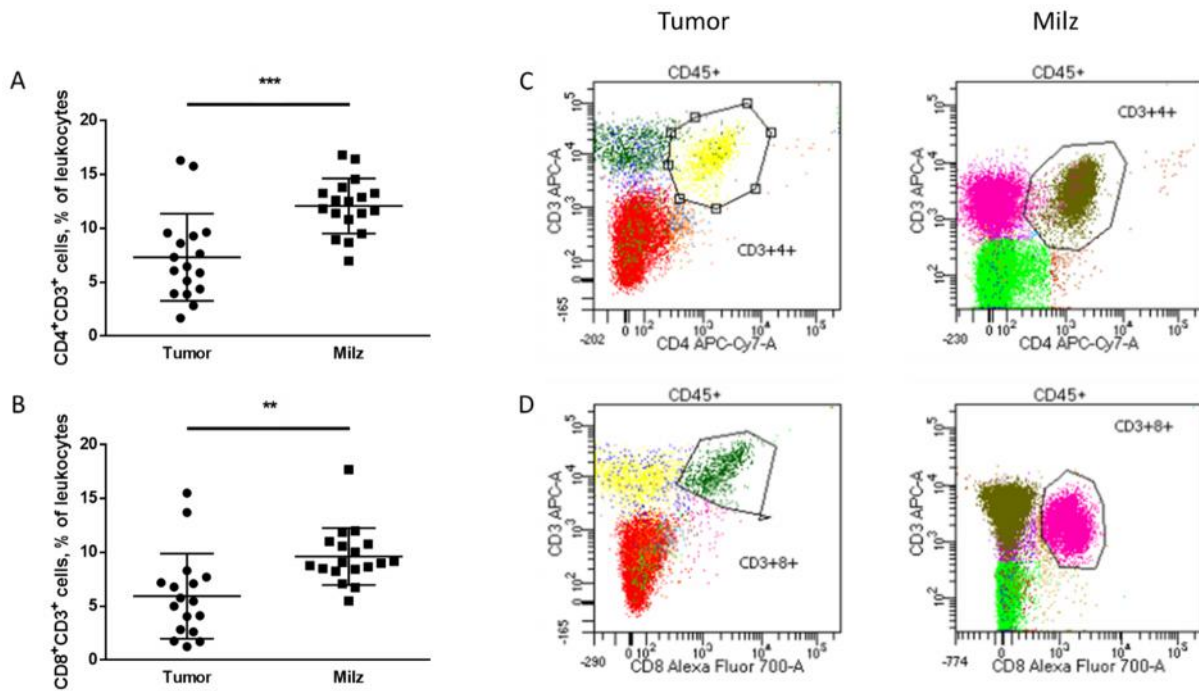


Abbildung 43: Quantifizierung der CD45⁺CD3⁺CD4⁺ und CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten aus CD45⁺ Leukozyten in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: % von CD4⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden Mäusen (n=18) vs. Tumor (n=17), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,001$ **[B]:** % von CD8⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden Mäusen (n=18) vs. Tumor (n=17), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,01$ **[C]:** CD3 vs. CD4 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren **[D]:** CD3 vs. CD8 aus CD45⁺ Zellen, repräsentative Dotplot FACS-Bilder von Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumoren

5.3.2.4 Die ratios von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen unterscheiden sich unter den Mäusen und Geweben nicht

Das Verhältnis der CD4⁺ T-Zellen zu den CD8⁺-T-Zellen ist aus der AIDS-Diagnostik hinreichend bekannt und kann auch bei anderen Erkrankungen des Immunsystems Schwankungen unterliegen. Deshalb war es interessant zu untersuchen ob und welchem Maße sich die ratios in den zuvor verglichenen Gruppen verändern bzw. unterscheiden.

5.3.2.4.1 Tumor

Bei Erstellung und statistischer Auswertung (Abb. 44A) dieser ratio aus den zuvor gemessenen Werten in Tumoreinzelsuspensionen der Wildtyp- und Knockoutmäuse, zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede.

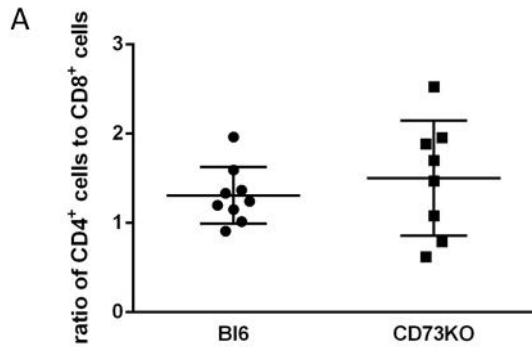


Abbildung 44: Ratio der CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: Verhältnis von CD4⁺ Zellen zu CD8⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen in Tumoren von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.3.2.4.2 Milzen von tumortragenden Mäusen

Bei Erstellung und statistischer Auswertung (Abb. 45A) dieser ratio aus den zuvor gemessenen Werten in Milzeinzelsuspensionen der Wildtyp- und Knockoutmäuse, zeigten sich ebenso keine Unterschiede.

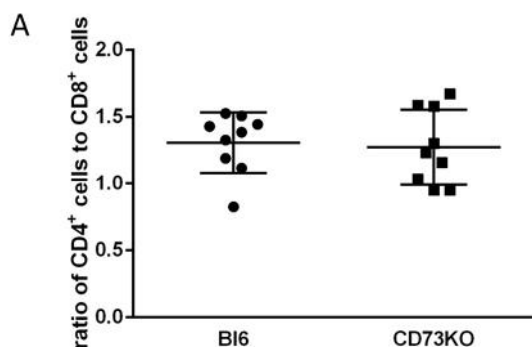


Abbildung 45: Ratio der CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: Verhältnis von CD4⁺ Zellen zu CD8⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=9), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.3.2.4.3 Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO

Bei Erstellung und statistischer Auswertung (Abb. 46A) dieser ratio aus den zuvor gemessenen Werten in Milzeinzelsuspensionen der nicht tumortragenden und tumortragenden Knockoutmäuse, zeigten sich auch hier keine wesentlichen Unterschiede.

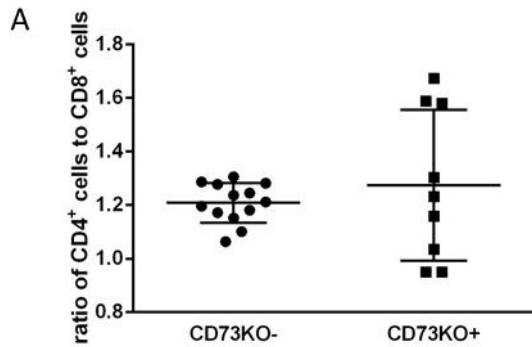


Abbildung 46: Ratio der $CD4^+$ zu $CD8^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: Verhältnis von $CD4^+$ Zellen zu $CD8^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden ($n=9$) vs. nicht tumortragenden ($n=13$) $CD73KO$, dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.3.2.4.4 Milzen von tumortragenden Mäusen vs. Tumor

Bei Erstellung und statistischer Auswertung (Abb. 47A) dieser ratio aus den zuvor gemessenen Werten in Milzeinzelsuspensionen aller tumortragenden Mäuse und Tumoreinzelsuspensionen aller Mäuse, zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede.

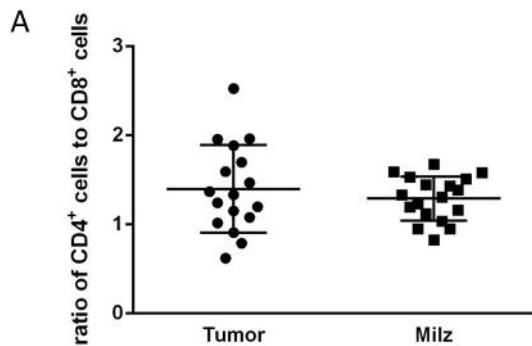


Abbildung 47: Ratio der $CD4^+$ zu $CD8^+$ Zellen in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: Verhältnis von $CD4^+$ Zellen zu $CD8^+$ Zellen aus $CD45^+CD3^+$ Zellen in Milzen von tumortragenden Mäusen ($n=18$) vs. Tumoren ($n=17$), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.3.2.5 Immunzellen der Milzen und Tumoren lassen sich in ihrer IFN γ -Produktion erfolgreich stimulieren

Ein weiterer wichtiger Punkt dieses Experiments war, wie zuvor bereits erwähnt, die durchflusszytometrische Messung der IFN γ ⁺ Zellen auf jeder möglichen Ebene, die dieses Panel bot. IFN γ bietet in diesem Zusammenhang einen guten intrazellulären Marker zur Einschätzung der immunologischen Aktivität der Zellen, die es produzieren. Außerdem kann durch eine vorherige Stimulation der Zellen in Kultur die Bereitschaft der Zellen noch mehr IFN γ zu produzieren gemessen werden und so weitere Rückschlüsse auf die immunologische Aktivität dieser Zellen gezogen werden.

5.3.2.5.1 Milzen unstimuliert vs. stimuliert

Eingangs wurden Milzeinzelsuspensionen von tumortragenden C57BL/6- und CD73KO-Mäusen, sowie von nicht tumortragenden CD73KO-Mäusen auf ihre erfolgreiche Stimulierbarkeit im FACS-Dotplot (Abb. 49A-F) auf den Ebenen CD45⁺, CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺, CD45⁺CD4⁺ und CD45⁺CD8⁺ untersucht. In der Darstellung im scatter-plot (Abb. 48A-F) sowie in den FACS-Bildern konnte man deutlich sehen, dass die Zellen der Milzsuspensionen erfolgreich stimuliert wurden.

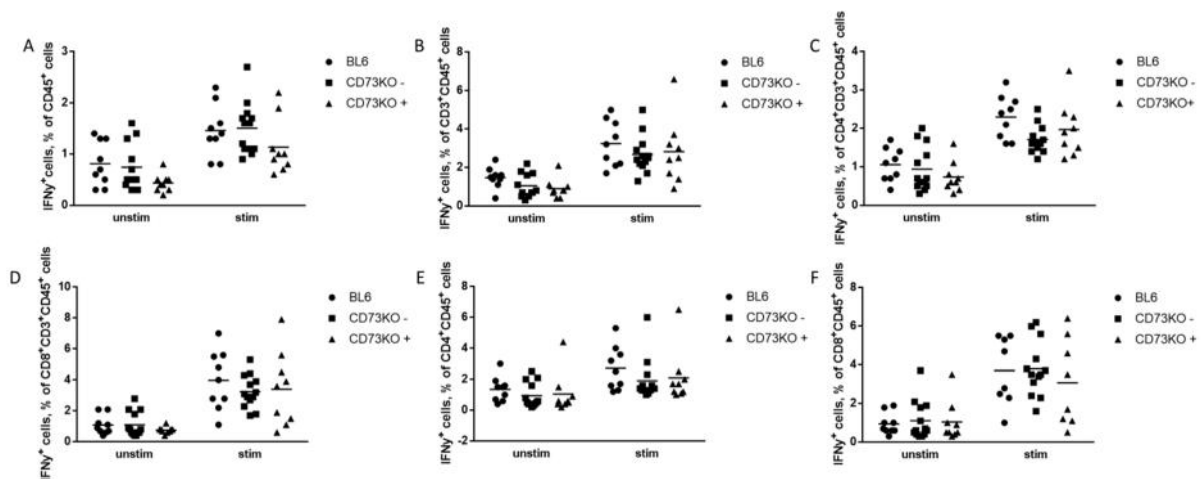


Abbildung 48: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben

[A]: % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9), tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und nicht tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=12) vs. stimuliert (n=13), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9), tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und nicht tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=12) vs. stimuliert (n=13), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9), tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und nicht tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=13) vs. stimuliert (n=12), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus

$CD45^+CD3^+CD8^+$ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9), tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und nicht tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=13) vs. stimuliert (n=13), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [E]: % $IFN\gamma^+$ Zellen aus $CD45^+CD4^+$ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9), tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und nicht tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=13) vs. stimuliert (n=13), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [F]: % $IFN\gamma^+$ Zellen aus $CD45^+CD8^+$ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9), tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und nicht tumortragenden CD73KO unstimuliert (n=12) vs. stimuliert (n=13), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

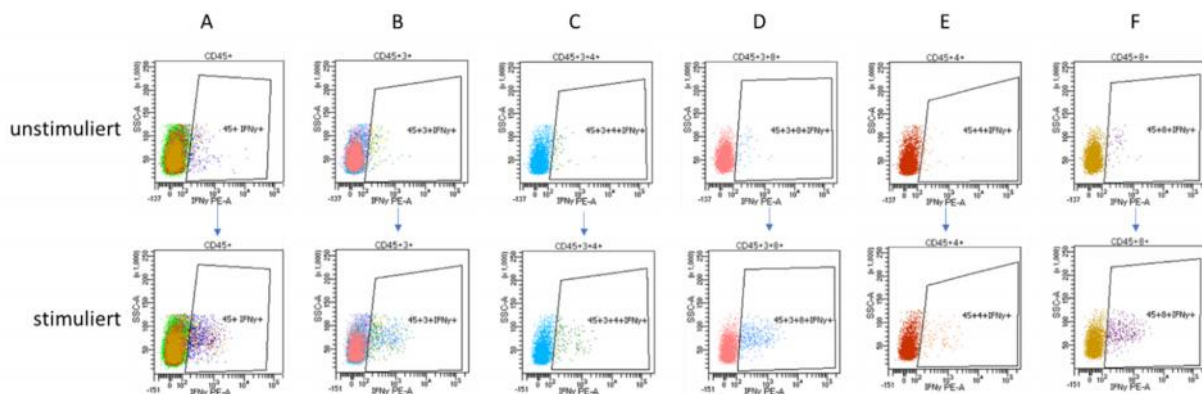


Abbildung 49: FACS Vergleich der $IFN\gamma$ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben

[A]: $IFN\gamma$ aus $CD45^+$ Zellen aus Milzen unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder [B]: $IFN\gamma$ aus $CD45^+CD3^+$ Zellen aus Milzen unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder [C]: $IFN\gamma$ aus $CD45^+CD3^+CD4^+$ Zellen aus Milzen unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder [D]: $IFN\gamma$ aus $CD45^+CD3^+CD8^+$ Zellen aus Milzen unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder [E]: $IFN\gamma$ aus $CD45^+CD4^+$ Zellen aus Milzen unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder [F]: $IFN\gamma$ aus $CD45^+CD8^+$ Zellen aus Milzen unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder

5.3.2.5.2 Tumoren unstimuliert vs. stimuliert

Analog zum Punkt zuvor wurden auch die Tumoreinzelsuspensionen von tumortragenden C57BL/6- und tumortragenden CD73KO-Mäusen im FACS-Dotplot (Abb. 51A-F) und im scatter-plot (Abb. 50A-F) auf ihre Stimulierbarkeit hin überprüft. Auch hier war deutlich zu sehen, dass die Zellen des Tumors auf eine Stimulation hin deutlich mehr $IFN\gamma$ produzieren.

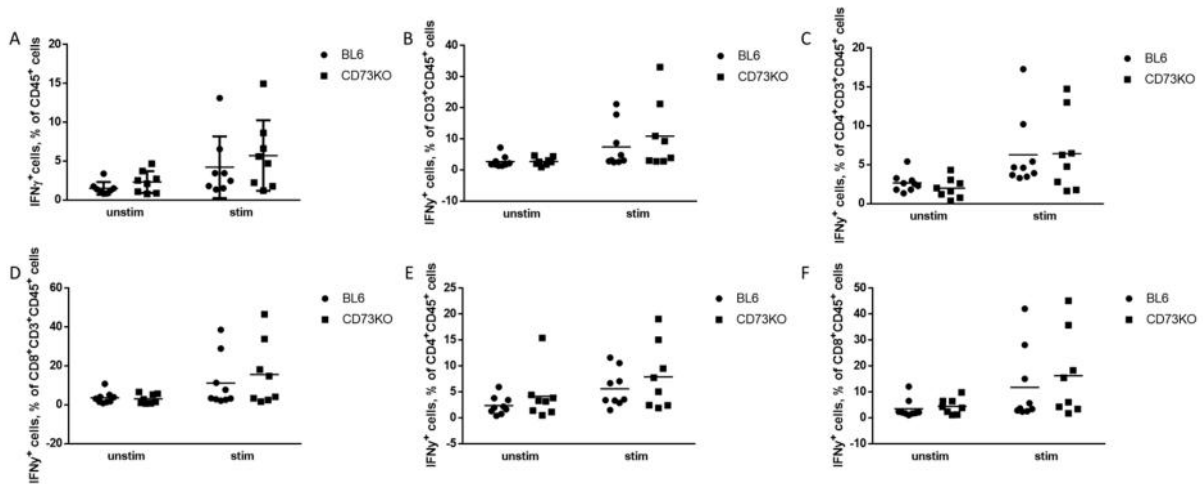


Abbildung 50: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben

[A]: % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 unstimuliert (n=8) vs. stimuliert (n=8) und CD73KO unstimuliert (n=8) vs. stimuliert (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und CD73KO unstimuliert (n=8) vs. stimuliert (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und CD73KO unstimuliert (n=8) vs. stimuliert (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und CD73KO unstimuliert (n=8) vs. stimuliert (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[E]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und CD73KO unstimuliert (n=8) vs. stimuliert (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 unstimuliert (n=9) vs. stimuliert (n=9) und CD73KO unstimuliert (n=8) vs. stimuliert (n=8), dargestellt als scatter-plot mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

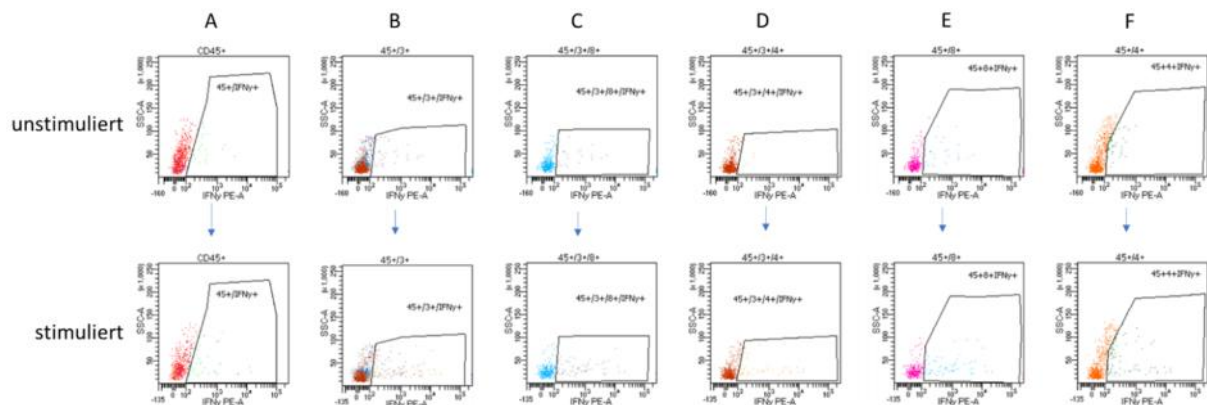


Abbildung 51: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben

[A]: IFN γ aus CD45⁺ Zellen aus Tumoren unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[B]:** IFN γ aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Tumoren unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[C]:** IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[D]:** IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[E]:** IFN γ aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[F]:** IFN γ aus CD45⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren unstimuliert vs. stimuliert repräsentative Dotplot FACS-Bilder

5.3.2.6 CD73KO-Mäuse zeigen auf verschiedenen Ebenen geringeres Basal-IFN γ in Milzen und erhöhtes Basal-IFN γ der CD8 $^{+}$ T-Zellen in Tumoren

5.3.2.6.1 Basal-IFN γ in Milzen von tumortragenden Mäusen

Zunächst wurden die unstimulierten Basalwerte der IFN γ^{+} Zellen aus Milzeinzelsuspensionen der tumortragenden Wildtyp- und CD73KO-Mäuse auf allen Ebenen im FACS-Dotplot verglichen (Abb. 53A-F), um festzustellen wie sich die immunologische Aktivität dieser Zellen darstellt. Bei der statistischen Auswertung der prozentualen Anteile dieser IFN γ^{+} Zellen an ihrer jeweiligen Elternpopulation, stellte sich heraus, dass CD73KO-Mäuse signifikant weniger IFN γ^{+} Zellen unter allen CD45 $^{+}$ Leukozyten aufweisen als die Vergleichsmäuse des Wildtyps (Abb. 52A). Auch bei den IFN γ^{+} Zellen aus den CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten stellte sich das gleiche Bild dar (Abb. 52B). Bei den CD4 $^{+}$ T-Zellen deutete sich unter den CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen eine Tendenz zum gleichen Bild ab (Abb. 52C) und aus den CD45 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen ergaben sich wiederum erneut signifikant geringere Werte der IFN γ^{+} Zellen für CD73KO-Mäuse (Abb. 52E). Einzig bei den CD8 $^{+}$ -T-Zellen ergaben sich sowohl aus den CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ (Abb. 52D) und den CD45 $^{+}$ CD8 $^{+}$ Zellen (Abb. 52F) zwar rein optisch ebenfalls geringere Werte bei CD73KO-Mäusen, statistisch signifikant waren diese jedoch nicht.

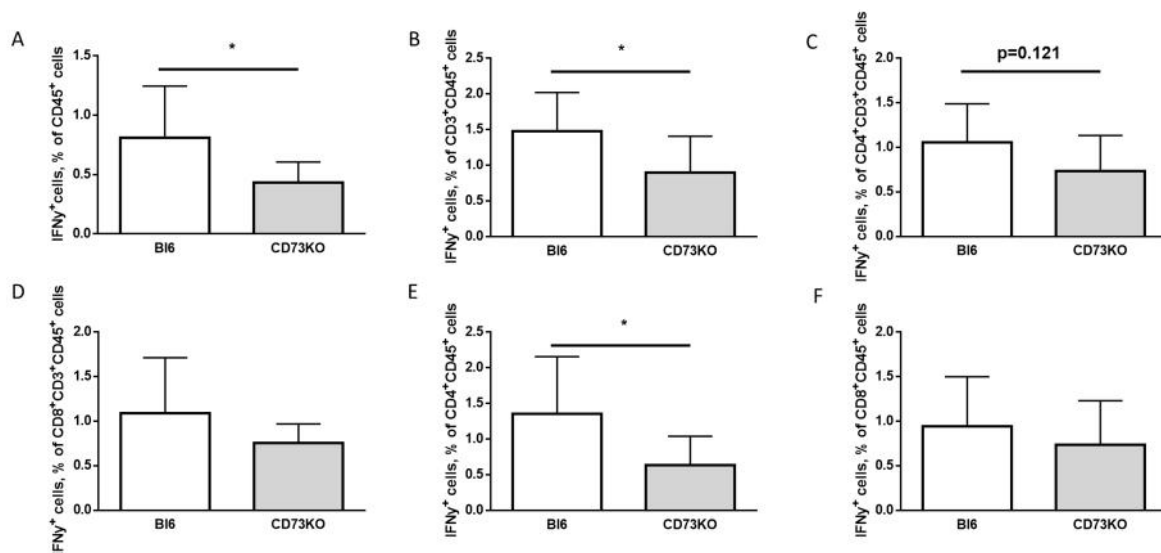


Abbildung 52: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben

[A]: % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,05$ **[B]:** % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p < 0,05$ **[C]:** % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p = 0,121$ **[D]:** % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ Zellen aus Milzen von

tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p=0,149$ [E]: % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=8) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test $p<0,05$ [F]: % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=8) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

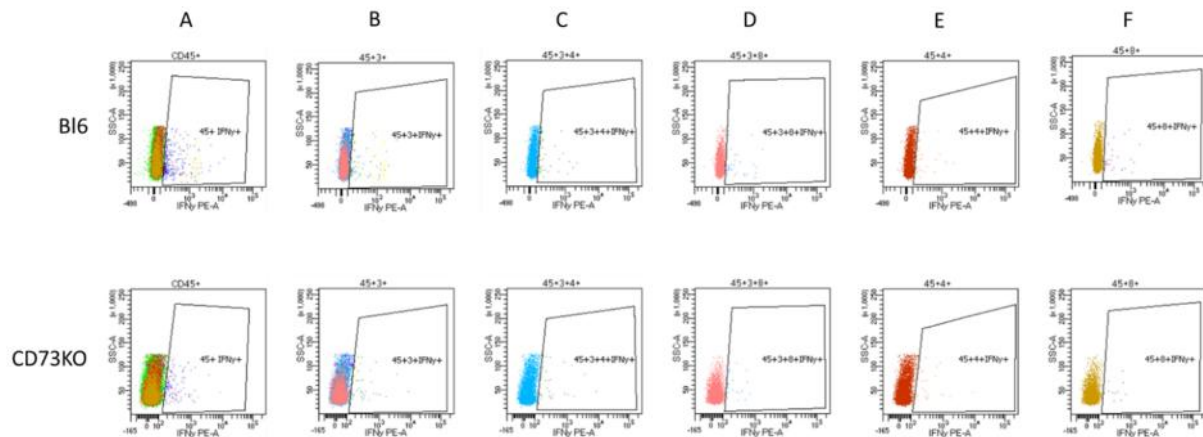


Abbildung 53: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben

[A]: IFN γ aus CD45⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert [B]: IFN γ aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert [C]: IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert [D]: IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert [E]: IFN γ aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert [F]: IFN γ aus CD45⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden C57BL/6 vs. tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert

5.3.2.6.2 Basal-IFN γ in Tumoren

Analog zu den Milzeinzelsuspensionen wurden nun die unstimulierten Basalwerte der IFN γ ⁺ Zellen aus Tumorzeinzelsuspensionen der tumortragenden Wildtyp- und CD73KO-Mäuse auf allen Ebenen im FACS-Dotplot verglichen (Abb. 55A-F). Bei der statistischen Auswertung dieser prozentualen Anteile der IFN γ ⁺ Zellen an ihrer jeweiligen Elternpopulation zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede (Abb. 54A-E), mit Ausnahme der IFN γ ⁺ Zellen aus den CD45⁺CD8⁺-T-Zellen, bei denen CD73KO-Mäuse signifikant mehr IFN γ ⁺ Zellen in den Tumoren aufwiesen als die Mäuse des Wildtyps (Abb. 54F).

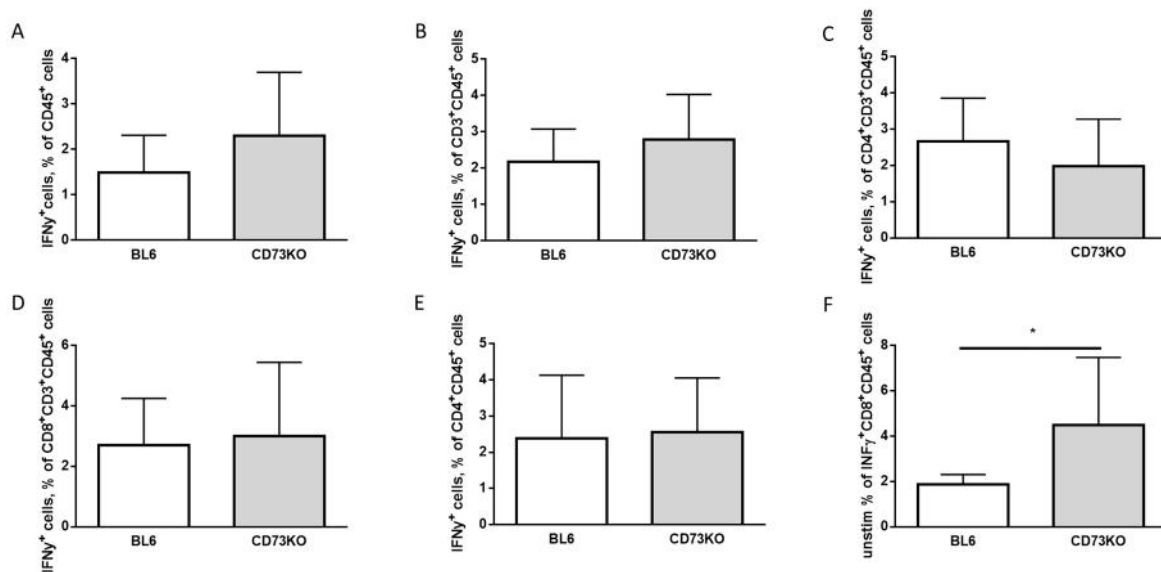


Abbildung 54: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben

[A]: % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[E]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=7) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 (n=7) vs. CD73KO (n=8) Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p<0,05

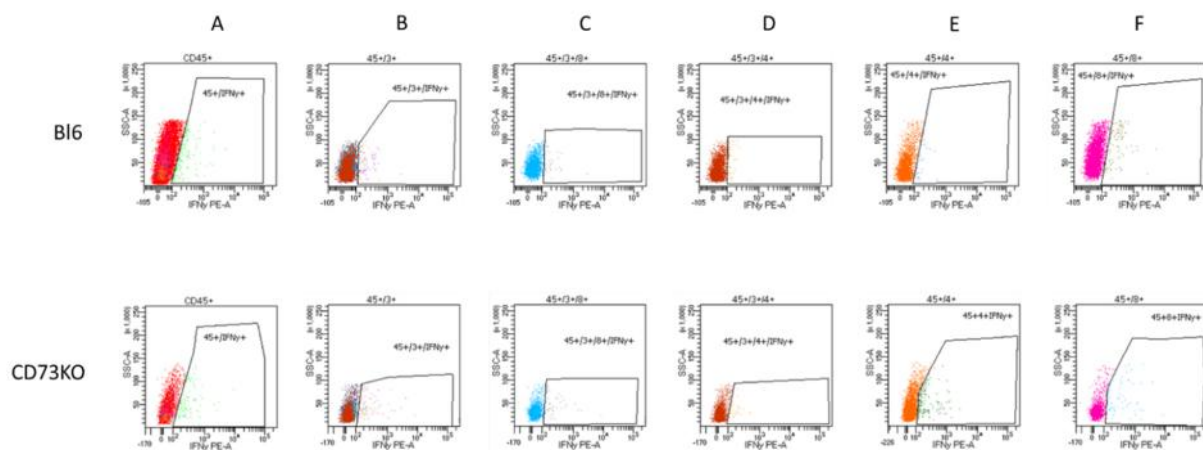


Abbildung 55: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben

[A]: IFN γ aus CD45⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 vs. CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[B]:** IFN γ aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 vs. CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[C]:** IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 vs. CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[D]:** IFN γ aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 vs. CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[E]:** IFN γ aus

CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 vs. CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert [F]: IFN γ aus CD45⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren von C57BL/6 vs. CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert

5.3.2.7 CD73KO-Mäuse zeigen auf mehreren Ebenen eine höhere ratio von stimuliertem zu unstimuliertem IFN γ in Tumoren

5.3.2.7.1 IFN γ -Ratio stimuliert zu unstimuliert in Milzen von tumortragenden Mäusen

Zur Verdeutlichung der Stimulierbarkeit der IFN γ -Produktion der einzelnen Zellen in den Milzeinzelsuspensionen wurde jeweils das Verhältnis der prozentualen Anteile der IFN γ ⁺ Zellen an deren Elternpopulation der stimulierten Proben zu denen der unstimulierten Proben errechnet. Dieses im Folgenden ratio genannte Verhältnis wurde auf allen zuvor definierten Ebenen der Wildtyp- und CD73KO-Mäuse statistisch ausgewertet. Hierbei ergab sich bei keiner der sechs Zellpopulationen (Abb. 56A-F) ein Unterschied.

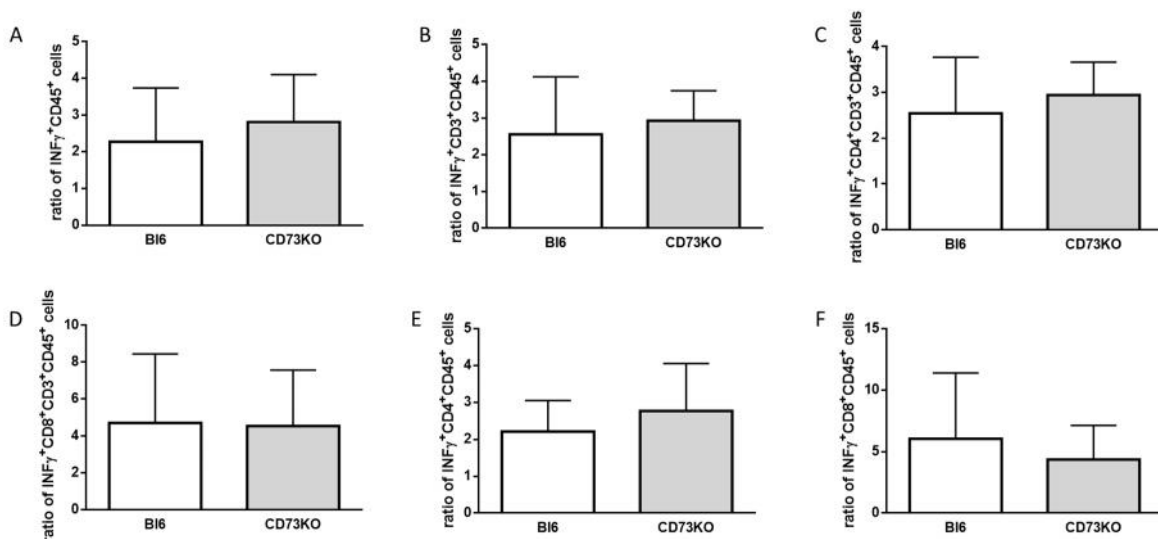


Abbildung 56: Statistischer Vergleich der ratios aus stimulierten zu unstimulierten Proben IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [B]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [C]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [D]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [E]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test [F]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD8⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden C57BL/6 (n=9) vs. tumortragenden CD73KO (n=9), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.3.2.7.2 IFN γ -Ratio stimuliert zu unstimuliert in Tumoren

Ebenso wurde aus den stimulierten und unstimulierten Proben der Tumoreinzelsuspensionen eine ratio errechnet und statistisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich rein optisch bei allen sechs Zellpopulationen eine höhere ratio bei CD73KO-Mäusen. Diese war nach statistischer Auswertung im Falle von CD45 $^{+}$ Leukozyten (Abb. 57A) und CD45 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen (Abb. 57E) jedoch nicht signifikant. Anders stellte es sich bei der Stimulierbarkeit der IFN γ -Produktion der CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten (Abb. 57B), der CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen (Abb. 57C) und der CD45 $^{+}$ CD8 $^{+}$ -T-Zellen (Abb. 57F) dar. Bei diesen Zellen war eine eindeutige Tendenz zu erkennen, dass die CD73KO-Mäuse höhere IFN γ -ratio-Werte aufweisen. Bei den CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ -T-Zellen waren die IFN γ -ratio-Werte der CD73KO-Mäuse signifikant höher (Abb. 57D).

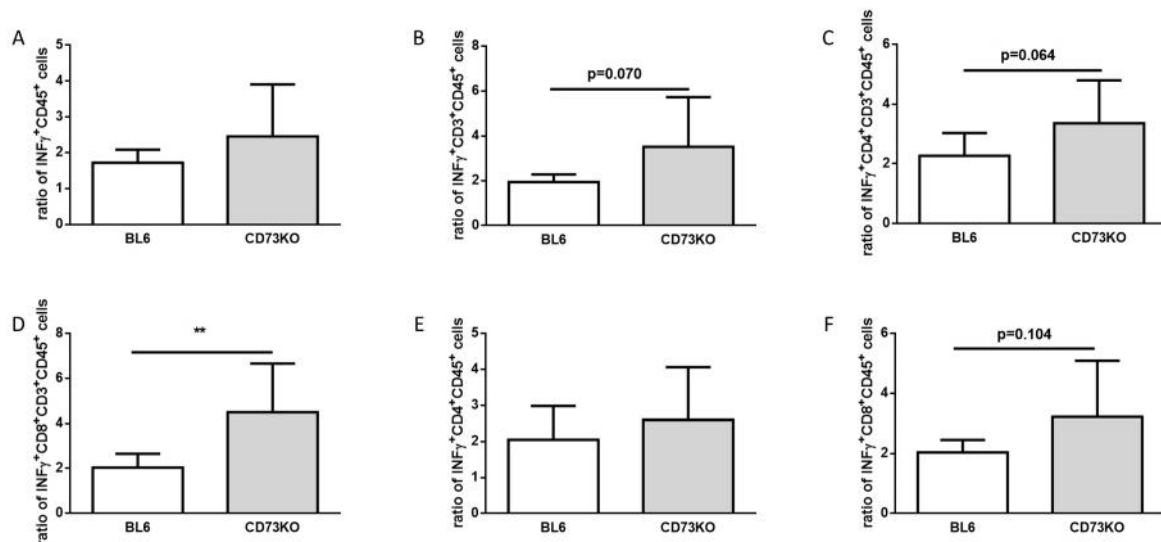


Abbildung 57: Statistischer Vergleich der ratios aus stimulierten zu unstimulierten Proben IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ Zellen in Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ Zellen in Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,07 **[C]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ in Tumoren von C57BL/6 (n=9) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,064 **[D]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ in Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p<0,01 **[E]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen in Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ^{+} Zellen aus CD45 $^{+}$ CD8 $^{+}$ Zellen in Tumoren von C57BL/6 (n=8) vs. CD73KO (n=8), dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,104

5.3.2.8 Tumortragende CD73KO-Mäuse zeigen tendenziell weniger Basal-IFN γ der Leukozyten in Milzen

5.3.2.8.1 Basal-IFN γ in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden CD73KO

Da die nicht tumortragenden CD73KO-Mäuse sich offensichtlich gegen den Tumor wehren konnten bzw. im besten Fall nie einen Tumor ausgebildet haben, war es ebenfalls sehr interessant zu überprüfen, ob die unstimulierten Basalwerte der IFN γ ⁺ Zellen aus den sechs Zellgruppen sich bei nicht tumortragenden (-Tumor) und tumortragenden (+Tumor) CD73KO-Mäusen in den Milzeinzelsuspensionen unterscheiden (Abb. 59A-F). Lediglich bei den IFN γ ⁺ Leukozyten zeichnete sich bei der statistischen Auswertung die Tendenz ab, dass die unstimulierten Basalwerte bei tumortragenden CD73KO-Mäusen niedriger sind (Abb. 58A). Bei den anderen fünf Zellgruppen konnten hingegen keine erheblichen Unterschiede der IFN γ -Basalwerte festgestellt werden (Abb. 58B-F).

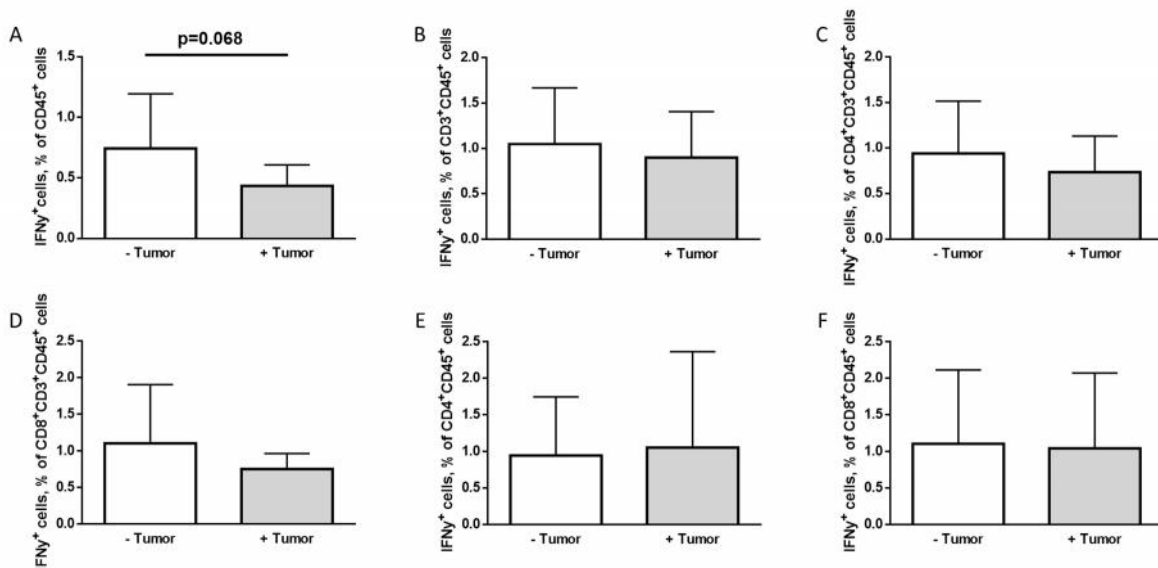


Abbildung 58: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben

[A]: % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=12) CD73KO Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test p=0,068 **[B]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=12) CD73KO Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[E]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO Basalwerte unstimuliert, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

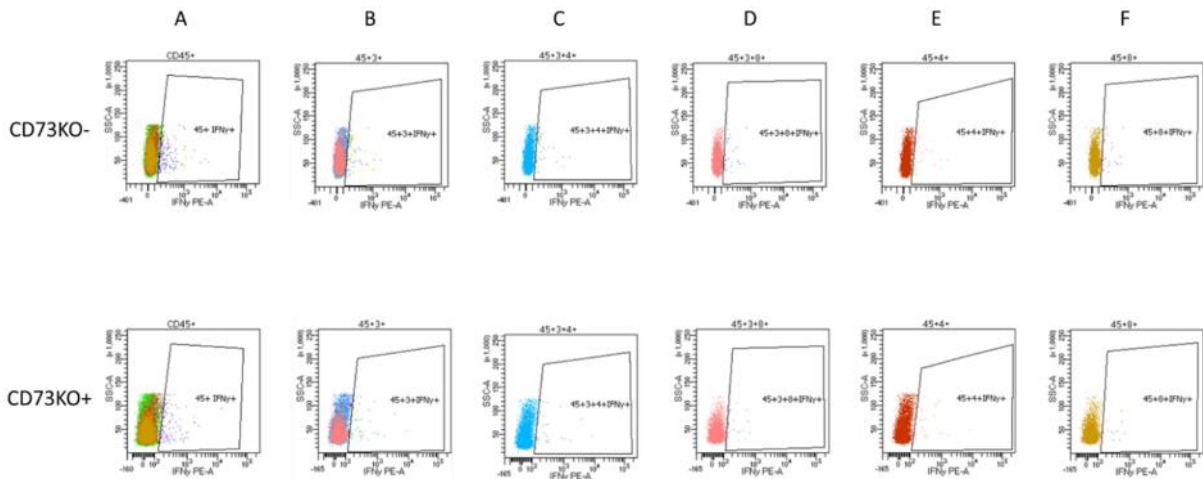


Abbildung 59: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben

[A]: IFN γ aus CD45 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[B]:** IFN γ aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[C]:** IFN γ aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[D]:** IFN γ aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[E]:** IFN γ aus CD45 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert **[F]:** IFN γ aus CD45 $^{+}$ CD8 $^{+}$ Zellen aus Milzen von tumortragenden vs. nicht tumortragenden CD73KO, repräsentative Dotplot FACS-Bilder unstimuliert

5.3.2.8.2 IFN γ -Ratio stimuliert zu unstimuliert in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden CD73KO

Auch bei Milzsuspensionen der tumortragenden und nicht tumortragenden CD73KO-Mäuse wurde eine ratio aus den Werten der stimulierten Proben zu denen der unstimulierten Proben erstellt. Bei der statistischen Auswertung der ratios aus allen sechs Zellgruppen (Abb. 60A-F) konnten jedoch keinerlei Unterschiede der IFN γ -ratios und somit der Bereitschaft der Zellen die IFN γ -Produktion zu erhöhen und damit aktiver zu werden, festgestellt werden.

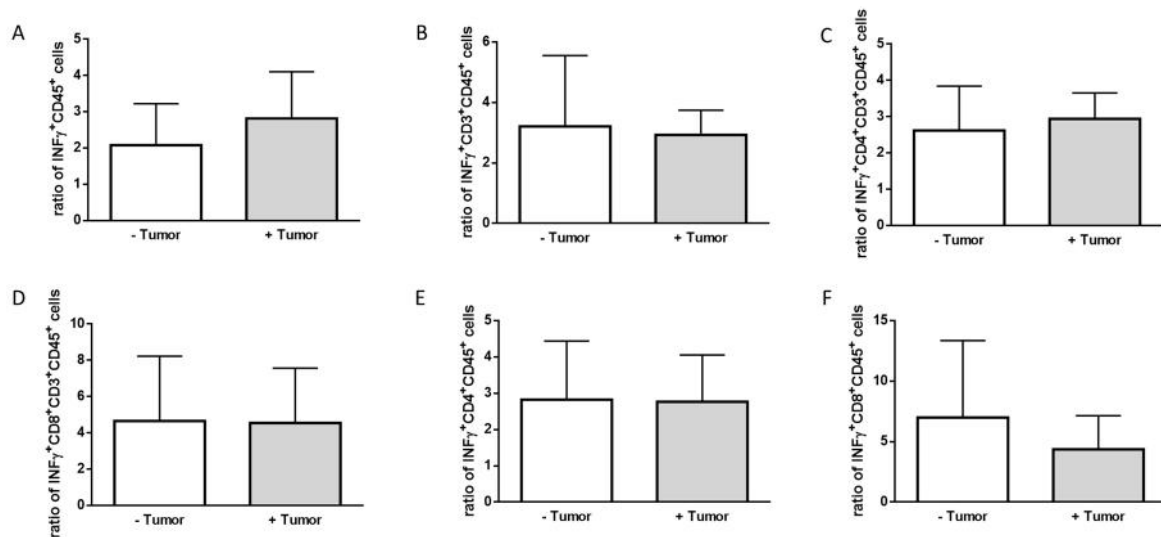


Abbildung 60: Statistischer Vergleich der ratios aus stimulierten zu unstimulierten Proben IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion

[A]: Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=12) CD73KO, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[E]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** Verhältnis stimuliert zu unstimuliert der % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD8⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden (n=9) vs. nicht tumortragenden (n=13) CD73KO, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

5.3.2.9 Stimulierte IFN γ -Werte der Lymphozyten und CD4⁺-T-Zellen aus Milzen korrelieren bei C57BL/6-Mäusen mit dem Tumolvolumen

Da die immunologische Aktivität der Zellen im Körper der Mäuse starken Einfluss auf das Potential hat, mit dem sich die Mäuse gegen etwaige Krankheiten und auch Tumoren wehren können, sollten im nächsten Schritt die Werte der IFN γ ⁺ Zellen aus den Milzeinzelsuspensionen in Korrelation zum Tumolvolumen der jeweiligen Maus gesetzt werden.

5.3.2.9.1 Korrelation Basal-IFN γ in Milzen zu Tumolvolumen C57BL/6

In dieser Auswertung wurden die unstimulierten Basalwerte der IFN γ ⁺ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden C57BL/6-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumolvolumen gesetzt. Bei der statistischen Auswertung ergaben sich in allen sechs Fällen (Abb. 61A-F) in der Spearman-Korrelation keine Signifikanzen.

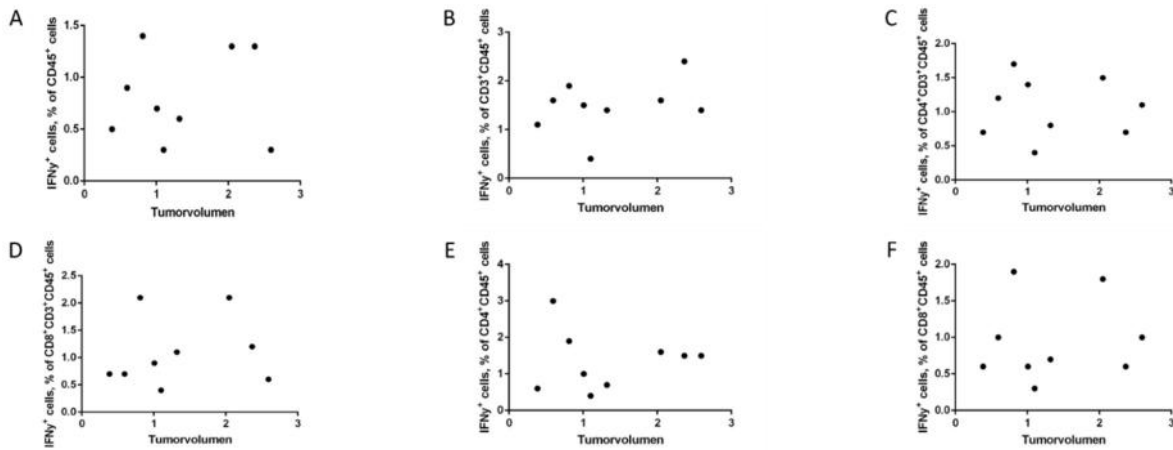


Abbildung 61: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Wildtyp-Mäusen mit Tumorzvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Milzen zu Tumorzvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[B]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Milzen zu Tumorzvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[C]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumorzvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[D]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen zu Tumorzvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[E]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumorzvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[F]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumorzvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation

5.3.2.9.2 Korrelation Basal-IFN γ in Milzen zu Tumorzvolumen CD73KO

In dieser Auswertung wurden die unstimulierten Basalwerte der IFN γ ⁺ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden CD73KO-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumorzvolumen gesetzt. Auch bei dieser statistischen Auswertung ergaben sich in allen sechs Fällen (Abb. 62A-F) in der Spearman-Korrelation keine Signifikanzen.

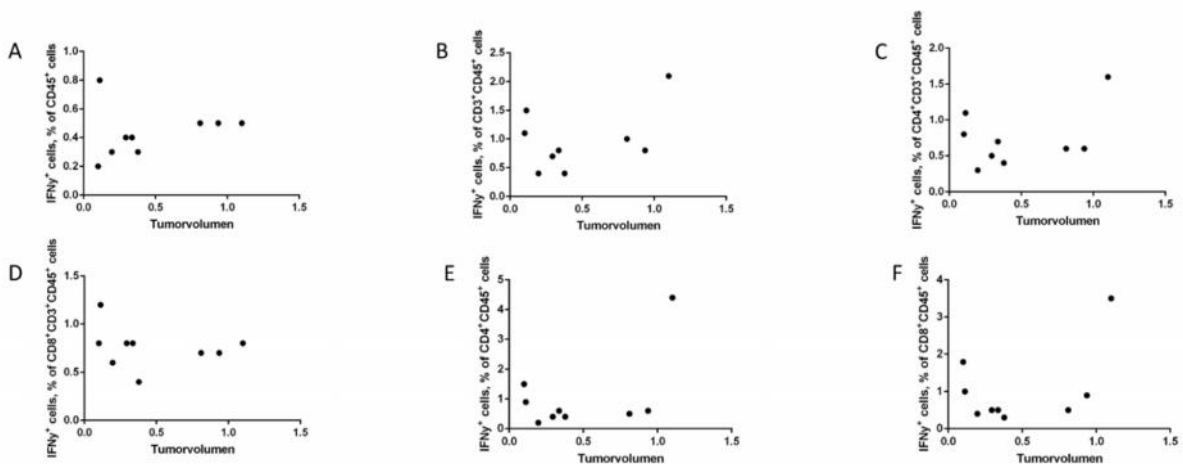


Abbildung 62: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden CD73KO-Mäusen mit Tumorzvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[B]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[C]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[D]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[E]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[F]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation

5.3.2.9.3 Korrelation stimuliertes-IFN γ in Milzen zu Tumolvolumen C57BL/6

In dieser Auswertung wurden nun die Werte der stimulierten IFN γ ⁺ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden C57BL/6-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumolvolumen gesetzt. Bei der statistischen Auswertung ergab sich bei den IFN γ ⁺ T-Lymphozyten (Abb. 63B) eine signifikante positive Korrelation des Tumolvolumens und der Anzahl der IFN γ ⁺ Zellen. Bei den IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 63C) zeigte sich außerdem eine Tendenz in dieselbe Richtung. In den anderen Fällen (Abb. 63A, D, E und F) konnte keine Korrelation festgestellt werden.

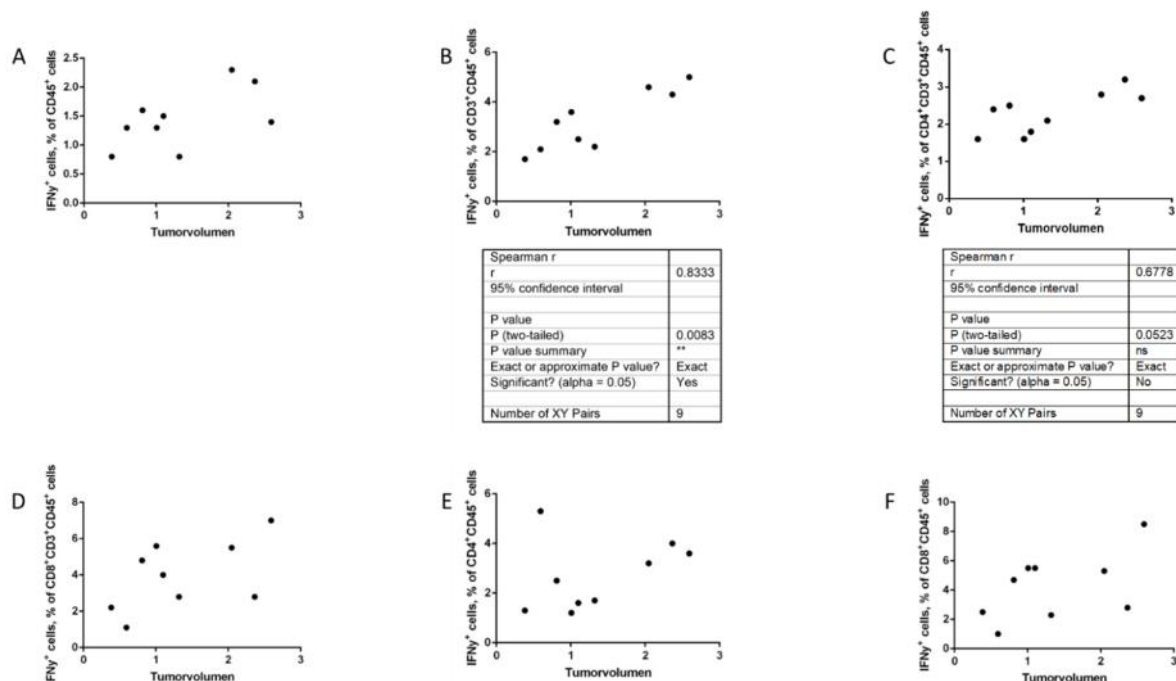


Abbildung 63: Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Wildtyp-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[B]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation p<0,01 **[C]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation p=0,0523 **[D]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[E]:**

Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation [F]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation

5.3.2.9.4 Korrelation stimuliertes-IFN γ in Milzen zu Tumolvolumen CD73KO

In dieser Auswertung wurden die Werte aus den stimulierten Proben der IFN γ ⁺ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden CD73KO-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumolvolumen gesetzt. Bei der statistischen Auswertung ergaben sich in allen sechs Fällen (Abb. 64A-F) in der Spearman-Korrelation keine Signifikanzen.

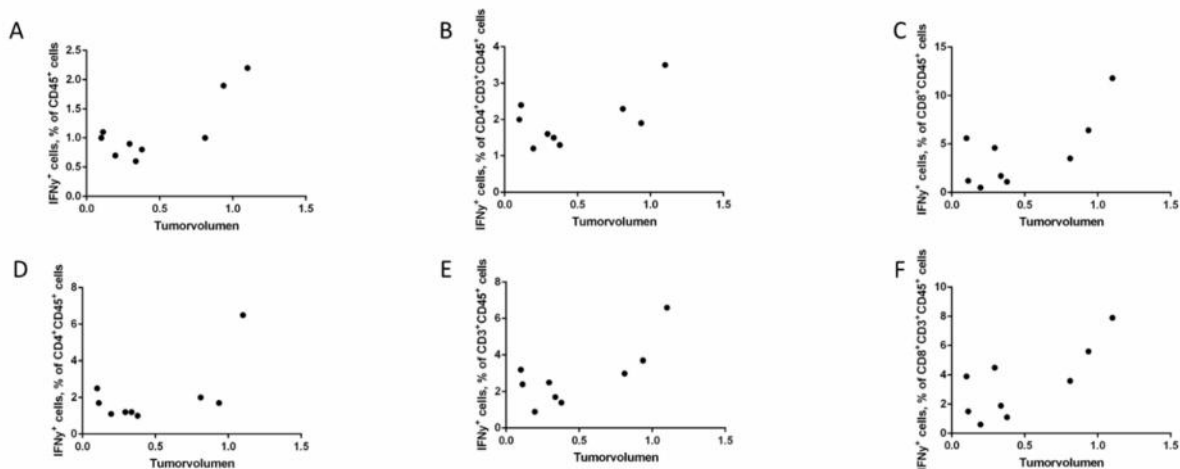


Abbildung 64: Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden CD73KO-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation [B]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation [C]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation [D]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation [E]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation [F]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Milzen zu Tumolvolumen in cm³ in CD73KO (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation

5.3.2.10 Bei CD73KO-Mäusen korrelieren stimulierte IFN γ -Werte aus Tumoren auf fast allen Ebenen mit dem Tumolvolumen

Ebenfalls entscheidend ist die immunologische Aktivität der Zellen direkt im Tumor und repräsentativ dafür, die IFN γ -Produktion dieser. Daher sollten Im nächsten Schritt die Werte der IFN γ ⁺ Zellen aus den Tumoreinzelsuspensionen in Korrelation zum Tumolvolumen der jeweiligen Maus gesetzt werden.

5.3.2.10.1 Korrelation Basal-IFN γ in Tumoren zu Tumolvolumen C57BL/6

In dieser Auswertung wurden die unstimulierten Basalwerte der IFN γ ⁺ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden C57BL/6-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumolvolumen gesetzt. Bei der statistischen Auswertung ergaben sich in allen sechs Fällen (Abb. 65A-F) in der Spearman-Korrelation keine Signifikanzen.

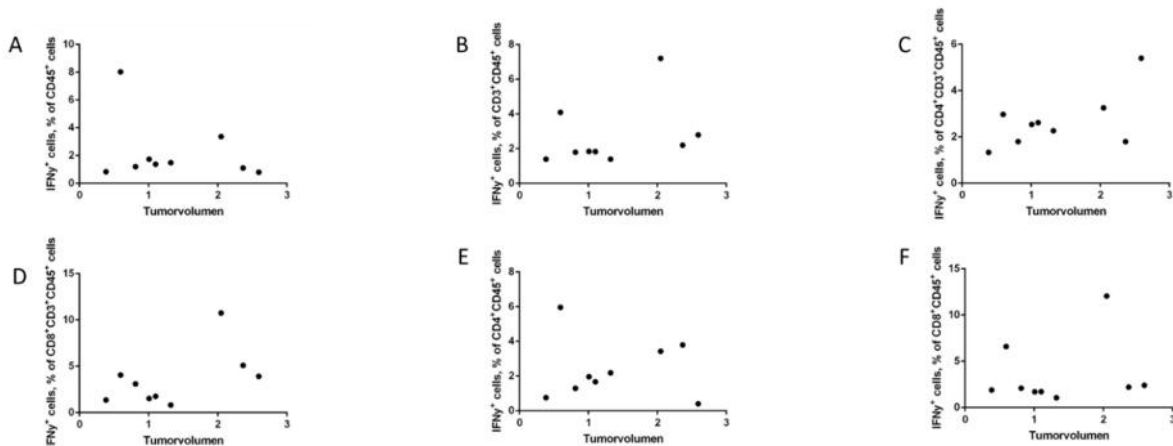


Abbildung 65: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von Wildtyp-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[B]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[C]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[D]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[E]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[F]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumolvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation

5.3.2.10.2 Korrelation Basal-IFN γ in Tumoren zu Tumolvolumen CD73KO

In dieser Auswertung wurden die unstimulierten Basalwerte der IFN γ ⁺ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden CD73KO-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumolvolumen gesetzt. Bei der statistischen Auswertung wurde deutlich, dass die Menge der IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 66C) positiv mit dem Tumolvolumen korreliert. Bei allen IFN γ ⁺ Leukozyten (Abb. 66A) zeigte sich eine starke Tendenz zu gleichem Bild. In den anderen vier Fällen (Abb. 66B, D, E und F) konnte keine Korrelation dieser beiden Variablen festgestellt werden.

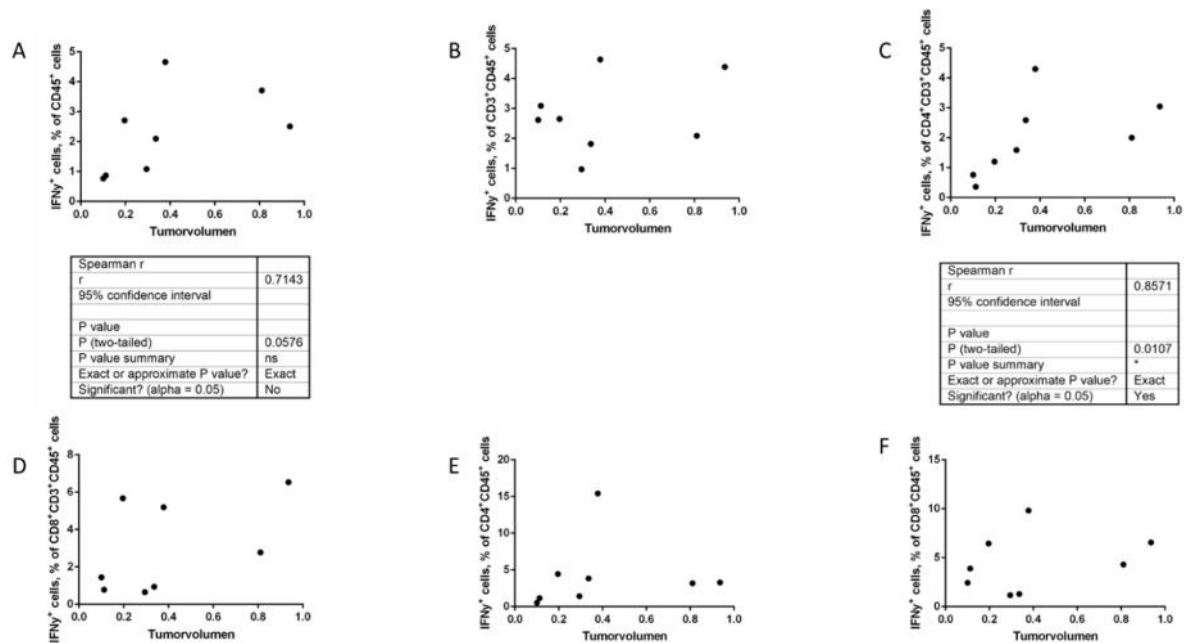


Abbildung 66: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von CD73KO-Mäusen mit Tumorstadium 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ Zellen aus CD45 $^{+}$ Zellen aus Tumoren zu Tumorstadium in cm 3 in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation p=0,0576 **[B]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ Zellen aus Tumoren zu Tumorstadium in cm 3 in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[C]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen aus Tumoren Tumorstadium in cm 3 in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation p<0,05 **[D]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ Zellen aus CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ Zellen aus Tumoren zu Tumorstadium in cm 3 in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[E]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ Zellen aus CD45 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen aus Tumoren zu Tumorstadium in cm 3 in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[F]:** Korrelation unstimulierter Basalwert % IFN γ Zellen aus CD45 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Zellen aus Tumoren zu Tumorstadium in cm 3 in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation

5.3.2.10.3 Korrelation stimuliertes-IFN γ in Tumoren zu Tumorstadium C57BL/6

In dieser Auswertung wurden nun die Werte der stimulierten IFN γ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden C57BL/6-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumorstadium gesetzt. Bei der statistischen Auswertung ergab sich bei den IFN γ CD4 $^{+}$ T-Zellen, sowohl aus den CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten (Abb. 67C) als auch aus den CD45 $^{+}$ Leukozyten (Abb. 67E) identifiziert, die klare Tendenz einer positiven Korrelation des Tumorstadiums und der Anzahl der IFN γ Zellen. In den anderen Fällen (Abb. 67A, B, D, F) konnte keine Korrelation festgestellt werden.

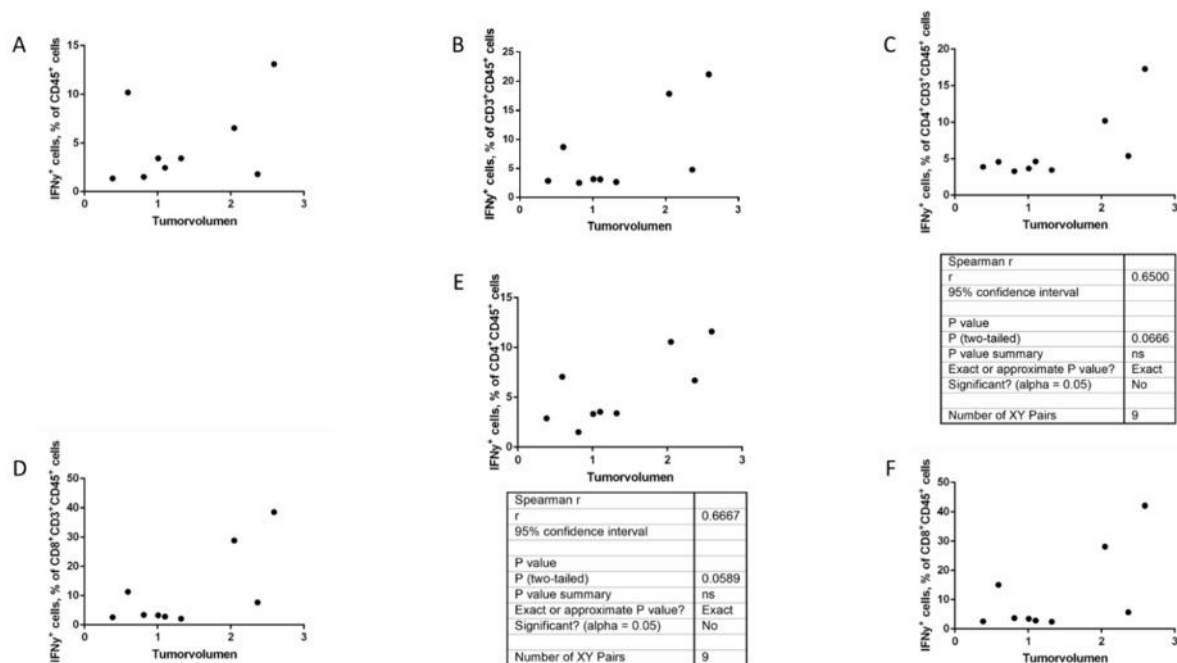


Abbildung 67: Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von Wildtyp-Mäusen mit Tumorvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[B]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[C]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation p=0,0666 **[D]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation **[E]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation p=0,0589 **[F]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in C57BL/6 (n=9), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation

5.3.2.10.4 Korrelation stimuliertes-IFN γ in Tumoren zu Tumorvolumen CD73KO

In dieser Auswertung wurden die Werte aus den stimulierten Proben der IFN γ ⁺ Zellen der sechs Elternpopulationen einer jeden tumortragenden CD73KO-Maus in Korrelation zu ihrem jeweiligen Tumorvolumen gesetzt. Statistisch ergab sich hierbei, dass die Menge der IFN γ ⁺ Leukozyten (Abb. 68A) und T-Lymphozyten (Abb. 68B) signifikant positiv mit dem Tumorvolumen korreliert. Auch die Menge der IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen aus den T-Lymphozyten (Abb. 68C) und den CD8⁺-T-Zellen, sowohl aus den T-Lymphozyten (Abb. 68D) als auch aus den Leukozyten (Abb. 68F), korrelierte positiv mit dem Tumorvolumen. Einzig auf Ebene der CD4⁺ T-Zellen aus den Leukozyten (Abb. 68E) konnte keine derartige Korrelation festgestellt werden.

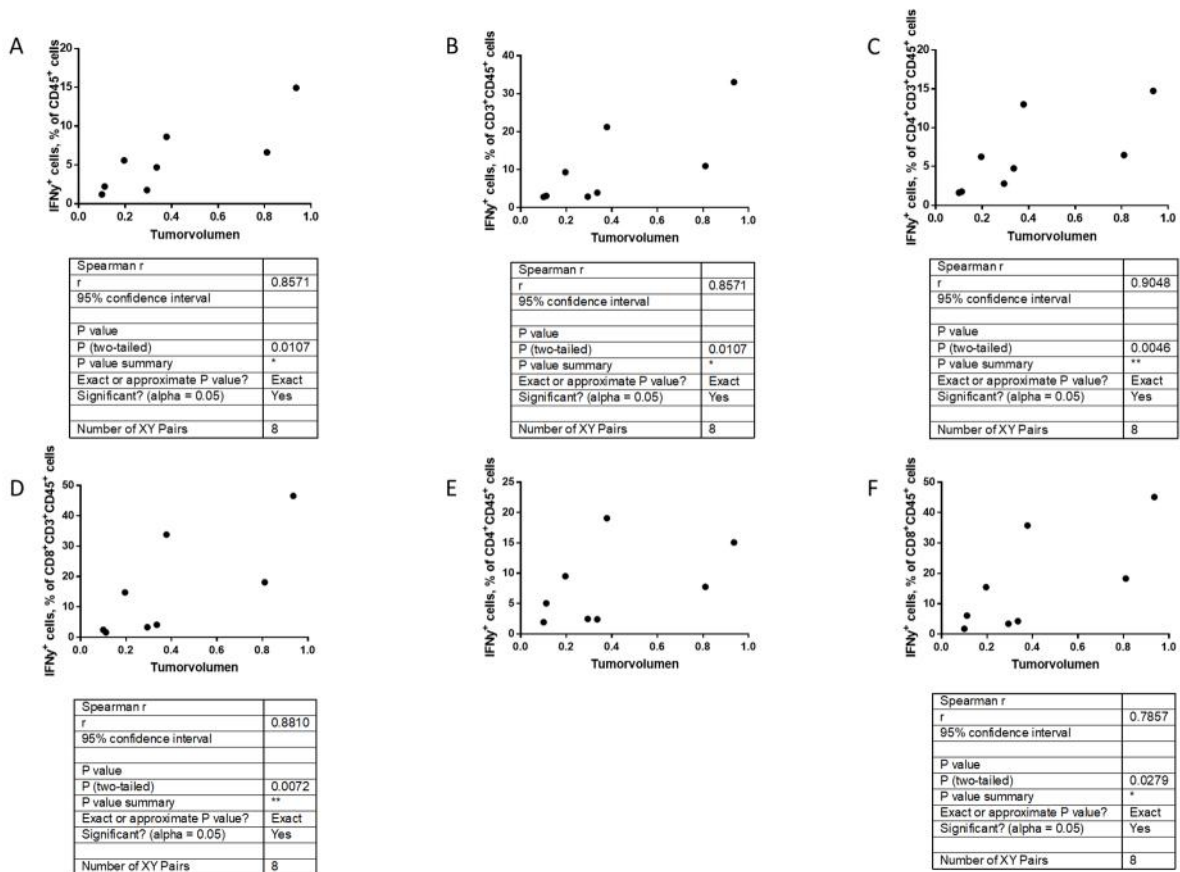


Abbildung 68 Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von CD73KO-Mäusen mit Tumorvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas

[A]: Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation $p < 0,05$ **[B]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation $p < 0,05$ **[C]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation $p < 0,01$ **[D]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation $p < 0,01$ **[E]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation $p < 0,05$ **[F]:** Korrelation stimuliert % IFN γ ⁺ Zellen aus CD45⁺CD4⁺ Zellen aus Tumoren zu Tumorvolumen in cm³ in CD73KO (n=8), dargestellt als xy points only graph, Spearman-Korrelation $p < 0,05$

5.4 Zytokinbehandlung

5.4.1 In vitro Behandlung von Splenozyten mit IL-13, IL-17, IFN γ und IL-13+TGF β hat keinen erhöhenden Einfluss auf die CD73-Expression

5.4.1.1 IL-13

Nach 48-stündiger Behandlung von je $1,5 \times 10^6$ Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen pro well in der 12-well-Platte mit IL-13 in den Mengen 1 ng, 5 ng, 10 ng und 50 ng zeigten sich in der

FACS-Messung (Abb. 70A-F) keinerlei Unterschiede in der Expression von CD73 auf den CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Lymphozyten (Abb. 69A-F).

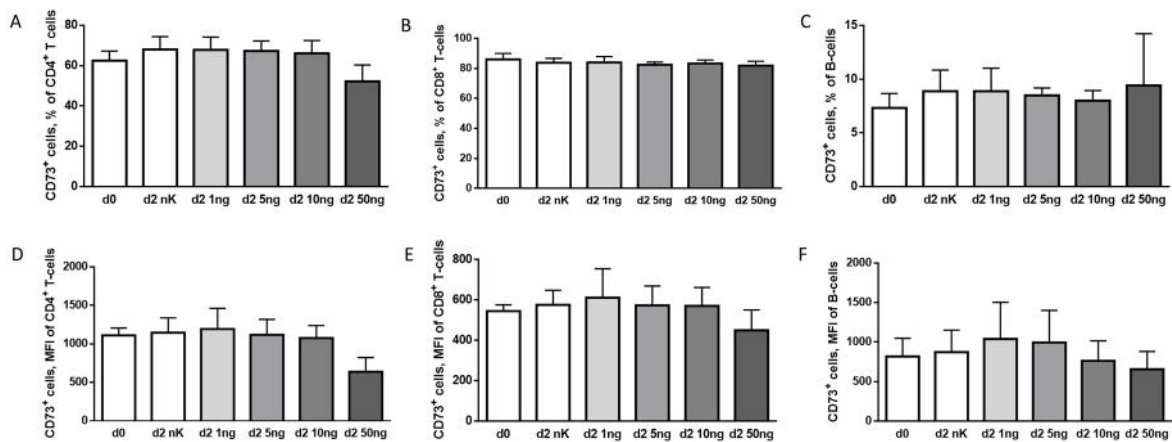


Abbildung 69: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13

[A]: % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=3) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=3), 1ng (n=3), 5ng (n=3), 10ng (n=3) und 50ng (n=3) IL-13, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[B]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=3) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=3), 1ng (n=3), 5ng (n=3), 10ng (n=3) und 50ng (n=3) IL-13, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[C]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=3) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=3), 1ng (n=3), 5ng (n=3), 10ng (n=3) und 50ng (n=3) IL-13, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[D]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=3) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=3), 1ng (n=3), 5ng (n=3), 10ng (n=3) und 50ng (n=3) IL-13, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[E]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=3) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=3), 1ng (n=3), 5ng (n=3), 10ng (n=3) und 50ng (n=3) IL-13, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[F]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=3) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=3), 1ng (n=3), 5ng (n=3), 10ng (n=3) und 50ng (n=3) IL-13, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test

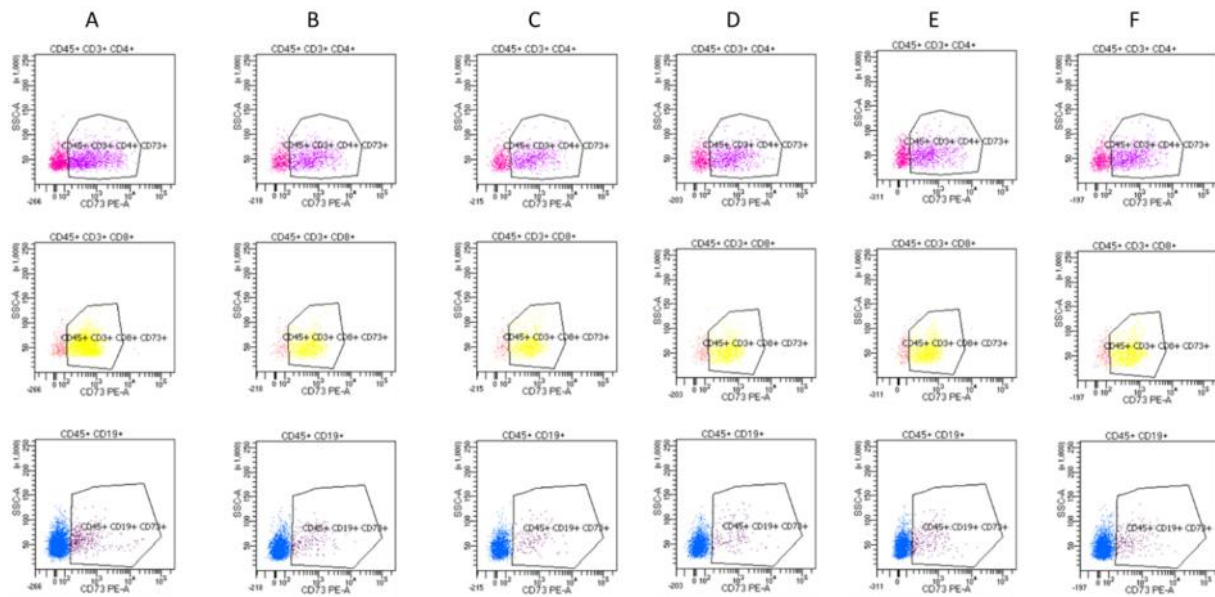


Abbildung 70: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13

[A]: CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁻CD19⁺ Zellen, Ausgangswerte unbehandelt an Tag 0, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[B]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁻CD19⁺ Zellen, unbehandelte Negativkontrolle an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[C]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁻CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 1 ng IL-13 an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[D]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁻CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 5 ng IL-13 an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[E]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁻CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 10 ng IL-13 an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[F]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁻CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 50 ng IL-13 an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder

5.4.1.2 IL-17A

Auch bei der 48-stündigen Behandlung von je $1,5 \times 10^6$ Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen pro well in der 12-well-Platte mit IL-17A in den Mengen 10 pg, 100 pg, 1 ng und 10 ng zeigten sich in der FACS-Messung (Abb. 72A-F) keinerlei Unterschiede in der Expression von CD73 auf den CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Lymphozyten (Abb. 71A-F).

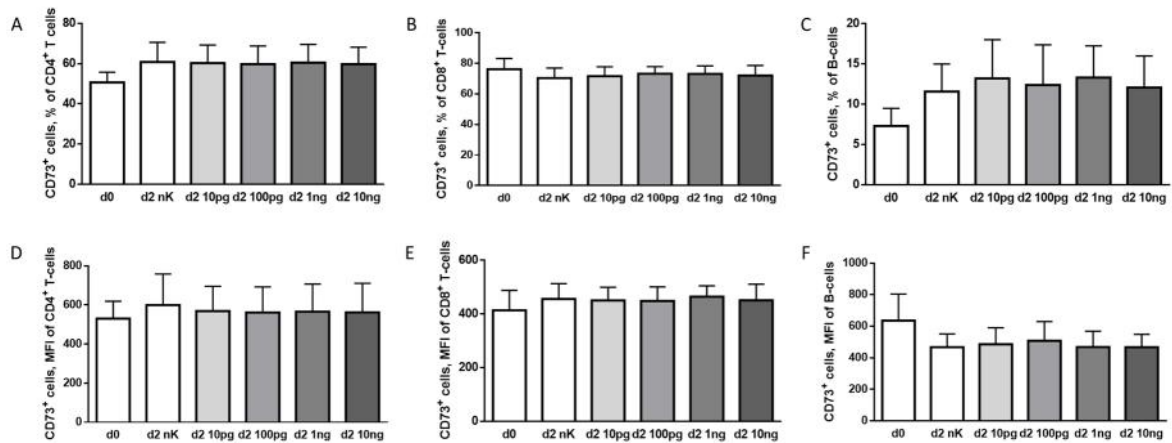


Abbildung 71: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-17A

[A]: % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=4) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=4), 10pg (n=4), 100pg (n=4), 1ng (n=4) und 10ng (n=4) IL-17A, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[B]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=4) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=4), 10pg (n=4), 100pg (n=4), 1ng (n=4) und 10ng (n=4) IL-17A, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[C]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=4) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=4), 10pg (n=4), 100pg (n=4), 1ng (n=4) und 10ng (n=4) IL-17A, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[D]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=4) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=4), 1ng (n=4), 5ng (n=4), 1ng (n=4) und 10ng (n=4) IL-17A, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[E]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=4) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=4), 10pg (n=4), 100pg (n=4), 10ng (n=4) und 50ng (n=4) IL-17A, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[F]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=4) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=4), 10pg (n=4), 100pg (n=4), 1ng (n=4) und 10ng (n=4) IL-17A, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test

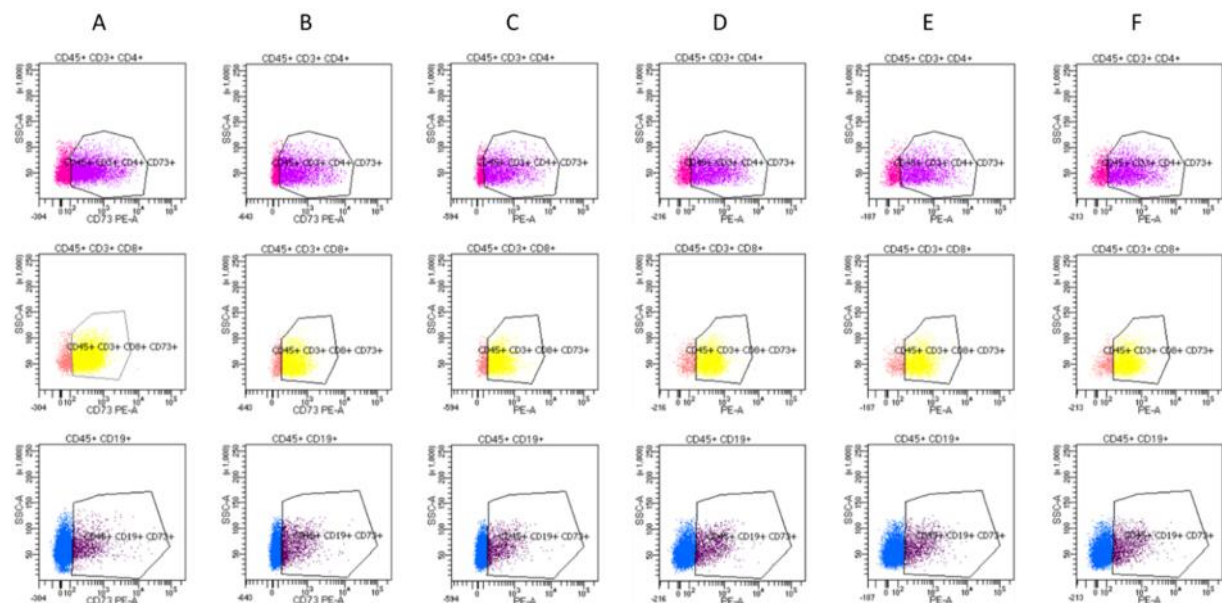


Abbildung 72: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-17A

[A]: CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, Ausgangswerte unbehandelt an Tag 0, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[B]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, unbehandelte Negativkontrolle an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[C]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 10 pg IL-17A an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[D]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 100 pg IL-17A an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[E]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 1 ng IL-17A an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[F]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 10 ng IL-17A an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder

5.4.1.3 IFN γ

Nach 48-stündiger Behandlung von je 1,5x10⁶ Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen pro well in der 12-well-Platte mit IFN γ in den Mengen 10 pg, 100 pg, 1 ng und 10 ng zeigten sich in der FACS-Messung (Abb. 74A-F) keinerlei Unterschiede in der Expression von CD73 auf den CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Lymphozyten (Abb. 73A-F).

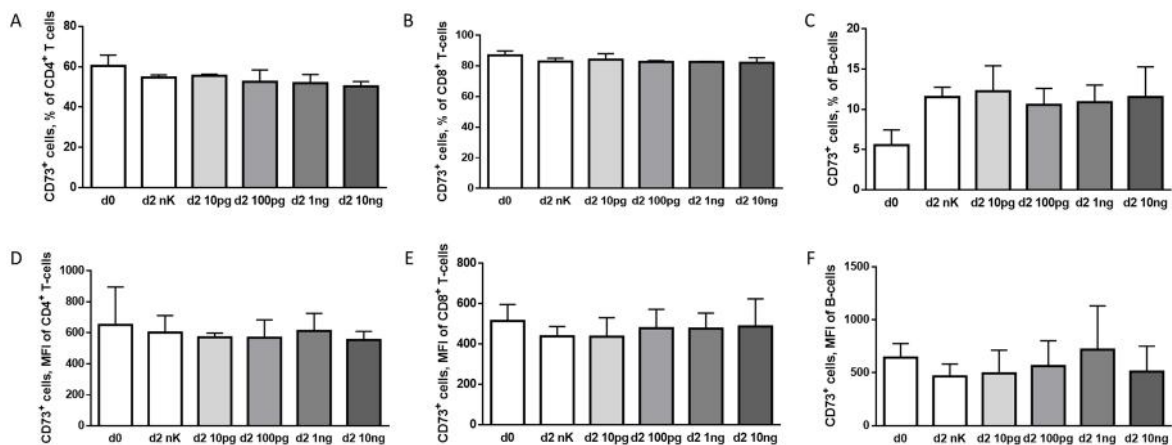


Abbildung 73: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IFN γ

[A]: % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) IFN γ , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[B]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) IFN γ , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[C]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) IFN γ , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[D]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 1ng (n=2), 5ng (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) IFN γ , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[E]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 10ng (n=2) und 50ng (n=2) IFN γ , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[F]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) IFN γ , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test

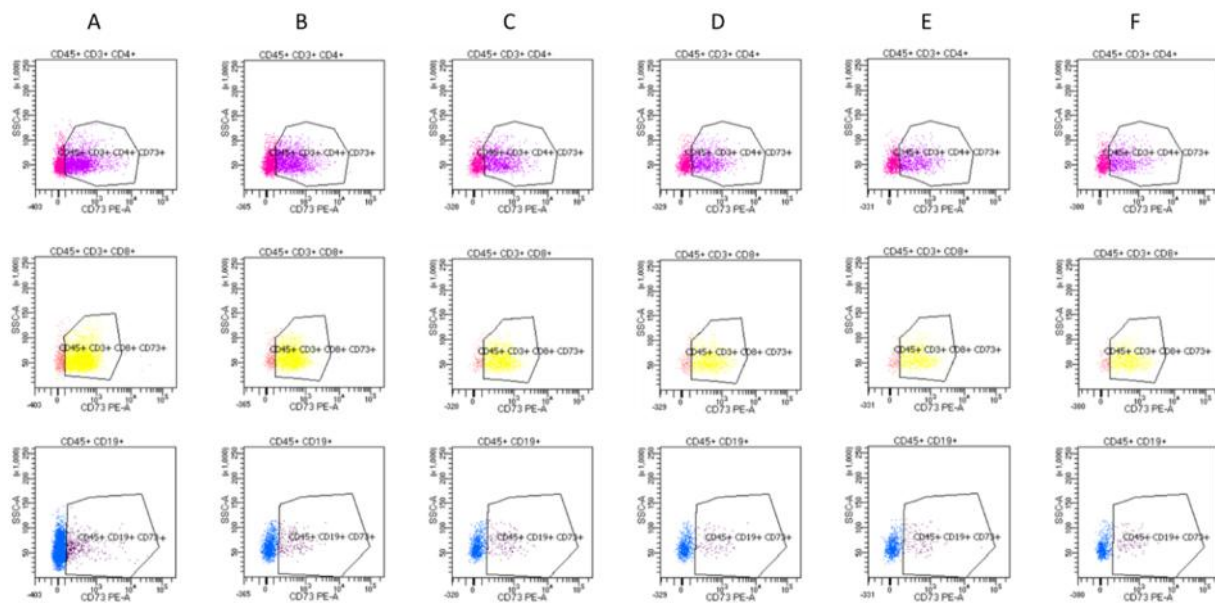


Abbildung 74: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IFN γ

[A]: CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, Ausgangswerte unbehandelt an Tag 0, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[B]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, unbehandelte Negativkontrolle an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[C]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 10 pg IFN γ an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[D]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 100 pg IFN γ an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[E]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 1 ng IFN γ an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[F]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 10 ng IFN γ an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder

5.4.1.4 IL-13+TGF β

Bei der 48-stündigen Behandlung von je $1,5 \times 10^6$ Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen pro well in der 12-well-Platte mit der Kombination aus IL-13 (50 ng) und TGF β (10 ng) zeigten sich in der FACS-Messung (Abb. 76A-C) keinerlei Unterschiede in der Expression von CD73 auf den CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Lymphozyten (Abb. 75A-F).

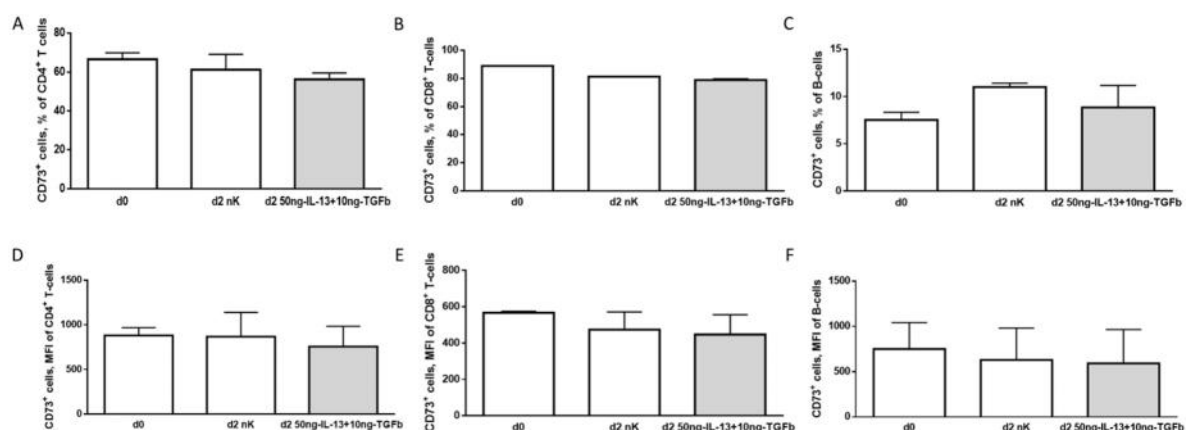


Abbildung 75: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13 und TGF- β

[A]: % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) TGF- β , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[B]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) TGF- β , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[C]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) TGF- β , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[D]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) TGF- β , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[E]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) TGF- β , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test **[F]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) TGF- β , dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ungepaarter t-test

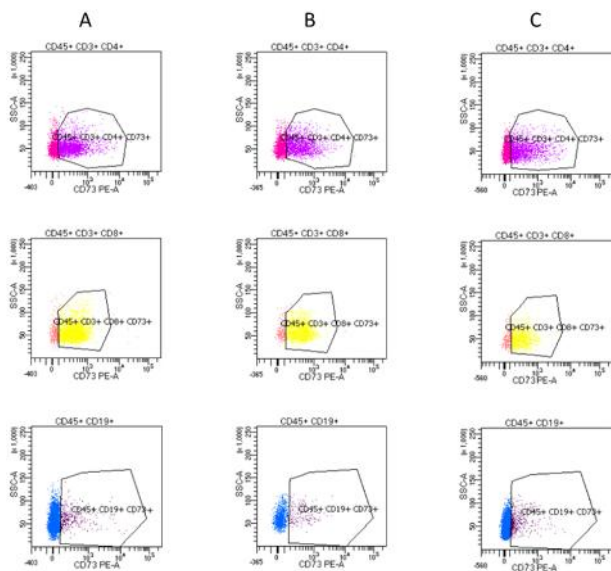


Abbildung 76: FACS-Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13 und TGF- β

[A]: CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, Ausgangswerte unbehandelt an Tag 0, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[B]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, unbehandelte Negtivkontrolle an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[C]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 50 ng IL-13 und 10ng TGF- β an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder

5.4.2 VEGF in hohen Konzentrationen lässt die CD73 Expression auf CD4⁺-T-Zellen sinken

5.4.2.1 VEGF

Bei der 48-stündigen Behandlung von je 1,5x10⁶ Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen pro well in der 12-well-Platte mit VEGF in den Mengen 10 pg, 100 pg, 1 ng und 10 ng zeigten sich in der FACS-Messung (Abb. 78A-F) keinerlei Unterschiede in der Expression von CD73 auf den CD8⁺ T-Zellen und B-Lymphozyten (Abb. 77B, C, E und F). Bei den CD4⁺ T-Zellen reduzierte

sich die CD73-Expression bei der Verwendung der beiden höchsten Konzentrationen 1 ng und 10 ng (Abb. 77A und D).

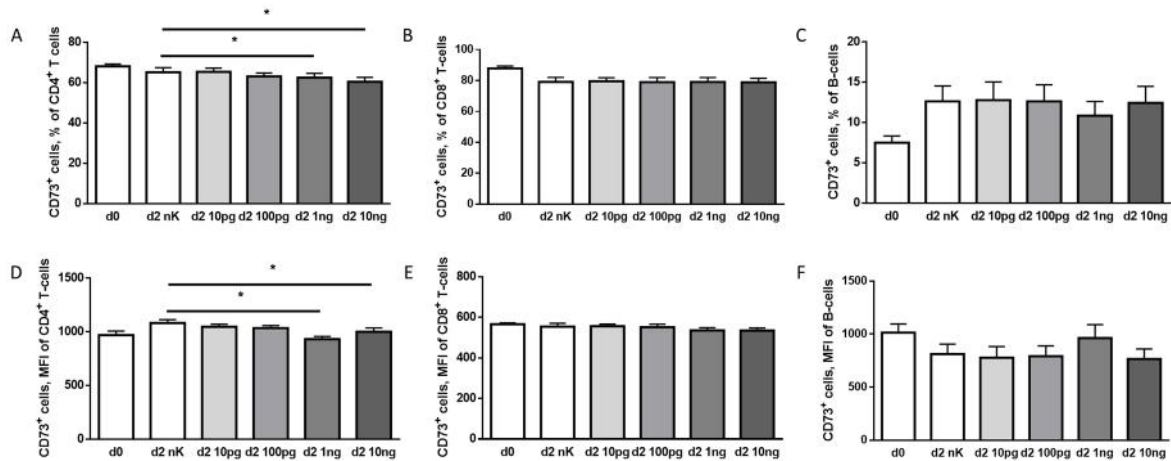


Abbildung 77: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit VEGF

[A]: % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) VEGF, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test p<0,05 **[B]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) VEGF, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[C]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) VEGF, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[D]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) VEGF, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test p<0,05 **[E]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) VEGF, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test **[F]:** MFI CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=2) und nach zweitägiger Behandlung von 1,5x10⁶/ml C57BL/6 Splenozyten mit ddH2O (d2 nK) (n=2), 10pg (n=2), 100pg (n=2), 1ng (n=2) und 10ng (n=2) VEGF, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, ANOVA Dunett's Test

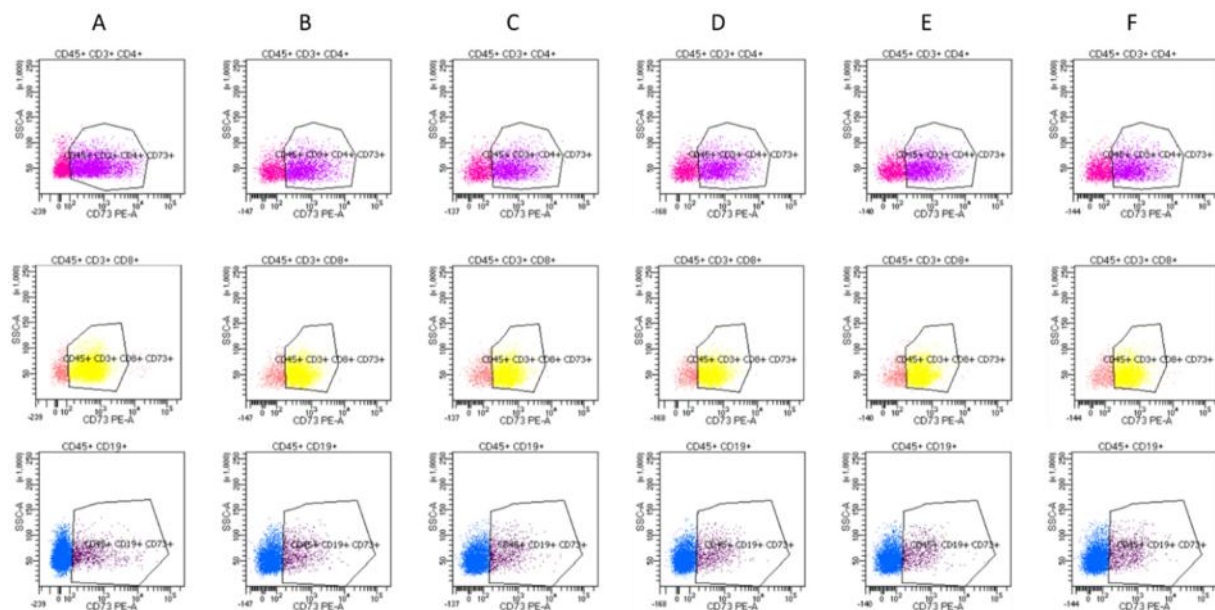


Abbildung 78: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit VEGF

[A]: CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, Ausgangswerte unbehandelt an Tag 0, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[B]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, unbehandelte Negativkontrolle an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[C]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 10 pg VEGF an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[D]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 100 pg VEGF an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[E]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 1 ng VEGF an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder **[F]:** CD73⁺ Zellen aus je CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺ und CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen, nach zweitägiger Behandlung mit 10 ng VEGF an Tag 2, repräsentative Dotplot FACS-Bilder

5.4.3 Die Expression von CD73 sinkt auf CD8⁺-T-Zellen und steigt auf B-Lymphozyten nach zwei Tagen in vitro ohne Behandlung

5.4.3.1 d0 vs d2

Da sich bei allen Messungen zwar keine Unterschiede der CD73-Expression zwischen der Negativkontrolle und den behandelten Proben feststellen lies, sich aber teilweise eine behandlungsunabhängige Erhöhung der CD73-Expression abzeichnete, wurden zusätzlich alle Werte der Tag 0 CD73-Expression mit denen der Negativkontrolle von Tag 2 statistisch verglichen. Hierbei zeigte sich, dass sich bei den CD8⁺-T-Zellen nach 2 Tagen ohne Behandlung eine Verminderung der CD73-Expression einstellt und bei den B-Lymphozyten im Gegensatz dazu eine deutliche Erhöhung (Abb. 79A-F).

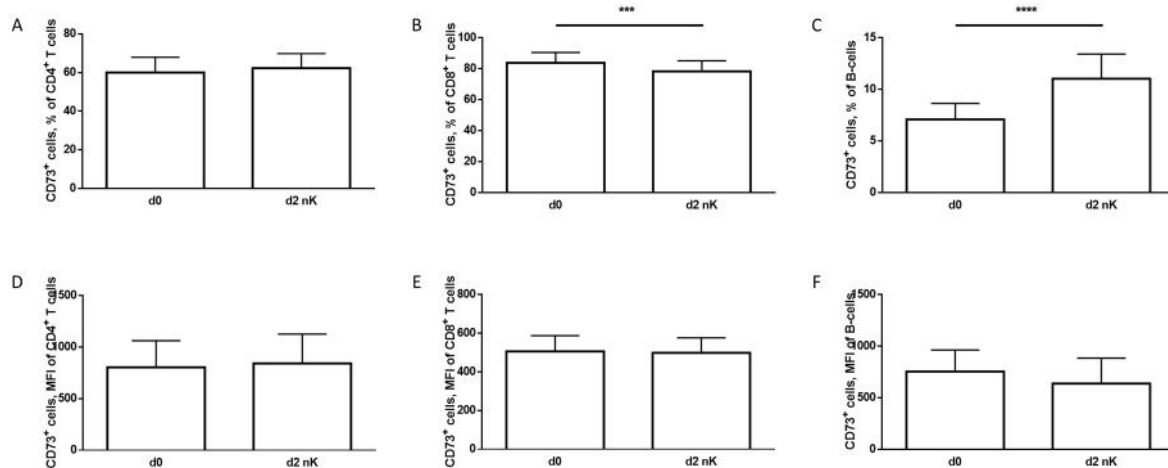


Abbildung 79: Statistischer Vergleich aller Werte von Tag 0 und der Negativkontrollen von Tag 2 aller Zytokinbehandlungen

[A]: % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=13) und der Negativkontrolle nach zwei Tagen in Kultur (d2 nK) (n=13), $1,5 \times 10^6$ /ml Splenozyten, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, gepaarter t-test **[B]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=13) und der Negativkontrolle nach zwei Tagen in Kultur (d2 nK) (n=13), $1,5 \times 10^6$ /ml Splenozyten, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, gepaarter t-test $p=0,0001$ **[C]:** % CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=13) und der Negativkontrolle nach zwei Tagen in Kultur (d2 nK) (n=13), $1,5 \times 10^6$ /ml Splenozyten, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, gepaarter t-test $p<0,0001$ **[D]:** MFI von CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=13) und der Negativkontrolle nach zwei Tagen in Kultur (d2 nK) (n=13), $1,5 \times 10^6$ /ml Splenozyten, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, gepaarter t-test **[E]:** MFI von CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=13) und der Negativkontrolle nach zwei Tagen in Kultur (d2 nK) (n=13), $1,5 \times 10^6$ /ml Splenozyten, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, gepaarter t-test **[F]:** MFI von CD73⁺ Zellen aus CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen an Tag Null (d0) (n=13) und der Negativkontrolle nach zwei Tagen in Kultur (d2 nK) (n=13), $1,5 \times 10^6$ /ml Splenozyten, dargestellt als column bar graph mit Mittelwert und Standardabweichung, gepaarter t-test

6 Diskussion

Das Pankreaskarzinom stellt in der heutigen Zeit eine der bedeutendsten und für die betroffenen Menschen fatalsten Tumorarten dar. Nahezu jeder Mensch, obgleich mit medizinischem/onkologischem Basiswissen oder Laie, weiß ob der schlechten Prognose und kurzen Überlebensraten der Patienten mit diesem Karzinom.

Auch unsere Haustiere erkranken und leiden sehr häufig an Tumorerkrankungen jeglicher Art. Jeder vierte Hund entwickelt beispielsweise im Laufe seines Lebens eine Neoplasie und bei den über zehnjährigen Hunden ist es bereits jeder zweite, der von einer Tumorerkrankung betroffen ist [99]. Wenngleich die Liste der häufigsten Tumorarten von Tumoren der Haut, Brustdrüsen oder Lymphomen dominiert wird, kommt das Pankreaskarzinom bei unseren Haustieren ebenso wie beim Menschen vor. Leider zeigen sich die Symptome ähnlich unspezifisch und auch bei der Erstdiagnose des Tumors sind, wie beim Menschen, häufig schon Metastasen und infauste Prognosen die Regel [100].

Die Wissenschaft setzt sich daher seit Langem sehr intensiv mit möglicher diagnostischer Früherkennung, Prävention und Therapien auseinander. Einen vielversprechenden und relativ neuen Ansatz spielt hierbei die Immunonkologie. Teil dessen ist seit längerem das Enzym ecto-5'-nucleotidase, oder nach dem cluster of differentiation auch CD73 genannt. Dieses Checkpointmolekül des Immunsystems spielt durch die Produktion von Adenosin eine bedeutende Rolle in der Immunsuppression und Angiogenese. Die Ausnutzung dieser Eigenschaften ermöglicht es dem Tumor Adenosin zu seinem Vorteil zu nutzen, sich so der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen und ungehindert auszuarten. Diese Tatsache macht es besonders interessant zu beleuchten, wie sich das Immunsystem in Abwesenheit des CD73 im Kampf gegen Tumoren adaptiert. Mithilfe eines CD73 Knockouts an Mäusen konnte bei zahlreichen *in vivo* Studien bereits die positive Beeinflussung und somit Verringerung der Tumorlast gezeigt werden. Hierbei wurden immer wieder mehr oder weniger große Bestandteile des Immunsystems mituntersucht und Zusammenhänge dieses positiven antitumoralen Effekts mit der Anwesenheit oder prozentualen Erhöhung von NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, sowie der IFN γ -Produktion letzterer gezeigt [62-64]. Auch allgemeine zelluläre und humorale Beeinflussungen des Immunsystems durch Adenosin (Abb. 1) sind bereits erforscht. Aufgrund dieser Ergebnisse hat sich uns die Frage gestellt, wie sich ein Knockout des CD73 auf das Immunsystem gesunder, gleichaltriger CD73KO-Mäuse auswirkt

und inwieweit sich Unterschiede zu ebenfalls gesunden, gleichaltrigen Wildtypmäusen detektieren lassen. Ebenso stellte sich uns die Frage, ob und in welchem Maße sich das Potential zur immunologischen Abwehr von Tumoren, stellvertretend gemessen durch die IFN γ -Produktion der Immunzellen, in den Milzen sowie den Tumoren beider oben genannten Mausgruppen unterscheidet. Deshalb lag das primäre Ziel dieser Arbeit darin, die immunologische Rolle des CD73 sowohl in gesunden Mäusen, durch einen Knockout, darzustellen, als auch durch eben jenen Knockout Unterschiede beim Potential der immunologischen Abwehr eines implantierten Pankreastumors zu charakterisieren und möglicherweise die Mechanismen dahinter zu beleuchten.

In beiden Fällen zeigen unsere Daten, dass sich CD73KO-Mäuse sehr wohl in einigen relevanten immunologischen Parametern von herkömmlichen Wildtypmäusen unterscheiden. So zeigen CD73KO-Mäuse sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene teils deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung des Immunsystems, wodurch sich die in dieser Arbeit ebenfalls detektierte deutlich verbesserte Immunabwehr von implantierten Tumoren plausibel erklären lässt. Auch die gemessenen Werte der IFN γ -Produktion durch Immunzellen in der Tumormikroumgebung geben Aufschluss darüber, wie sich der KO des CD73 positiv auf das immunologische Potential zur Abwehr von Tumoren auswirkt.

Während der KO des wichtigen Immunmoleküls CTLA4 zu einer drastischen pathologischen phänotypischen Veränderung mit akuter und systemischer Autoimmunität führt [101], konnten beim KO des CD73 keinerlei phänotypische Veränderungen der betroffenen Mäuse festgestellt werden. Teilweise zeigte sich zwar ein erhöhtes Aggressionspotential der KO-Mäuse gegenüber den Mäusen des Wildtyps, jedoch war diese Beobachtung eher subjektiv und zog sich nicht durch alle Versuche. Offensichtlich ist das Immunsystem im Falle des CD73-KOs besser in der Lage ausufernden autoimmunen Prozessen gegenzusteuern. Im höheren Alter (30 Wochen und älter) hingegen neigen CD73KO-Mäuse durch ihren proinflammatorischen vaskulären Phänotyp zu einer reduzierten Nierenfunktion [102].

Beim Vergleich der gesunden Mauspopulationen Wildtyp und CD73KO zeigte sich auf humoraler Ebene interessanterweise, dass die Blutserumkonzentration von IL-6 bei CD73KO-Mäusen reduziert ist. Aufgrund der Tatsache, dass IL-6 als Markerstoff akuter und chronischer Entzündungen fungiert [103], gehen wir an dieser Stelle davon aus, dass

CD73KO-Mäuse einen eher moderateren Entzündungstyp aufweisen. Da Adenosin über den A2A-Rezeptor die Produktion von IL-6 erhöht [104], kann man an dieser Stelle natürlich annehmen, dass durch den KO des CD73 und der somit verbundenen Verringerung des Adenosins, auch die Reduktion der Blutserumkonzentration von IL-6 bei CD73KO-Mäusen begründet ist.

Auf zellulärer Ebene des angeborenen Immunsystems zeigte sich, dass bei CD73KO-Mäusen die Menge der NK-Zellen und der aktivierten NK-Zellen reduziert ist. Dies ist eher überraschend, da durch die zuvor erwähnte Reduktion des aktiven Adenosins durch den Knockout eher eine Zunahme dieser Zellpopulation zu erwarten wäre [43], dies deckt sich jedoch mit den aktuellen Untersuchungen an gesunden B7-H1KO-Mäusen [105]. B7-H1 nimmt durch seine immunsupprimierende Rolle und seiner Bedeutung in der Tumorummunevasion eine ähnliche Rolle als Checkpointmolekül des Immunsystems, wie CD73 ein. Welche Mechanismen zu diesen unterschiedlichen Ausprägungen in den verschiedenen Studien führen, ist und bleibt unklar, jedoch kann man spekulieren, dass es durch die Reduktion an immunregulatorischem Adenosin zu einer Art Gegenregulation und somit Senkung der Menge an NK-Zellen kommt.

Des Weiteren konnten wir eine Reduktion der Menge der pDC und auch deren kostimulatorischem Molekül CD86 bei den KO-Mäusen detektieren. Dies stellt im Gegensatz zu den Untersuchungen an B7-H1KO-Mäusen eine gegenteilige Ausprägung dar, jedoch die Tatsache, dass die Menge der cDC unverändert blieb, konnte auch schon im Knockout-Modell mit B7H1-Mäusen gezeigt werden [105]. Da bei den cDC die MFI der beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 hingegen stieg, nehmen wir an dieser Stelle an, dass das Fehlen des CD73 Verschiebungen in der Menge der DC-Untergruppen hervorruft und somit zu einer Kompensation der Stimulatoren CD80 und CD86 führt. Der Einfluss von durch CD73 produziertem Adenosin auf die Aktivität der DC und die Selbstregulierung durch von DC produzierter Adenosindeaminase [106], zeigt deutlich, dass dieser Mechanismus starken intrinsischen Kompensationsmechanismen unterliegt. So wurde beispielsweise die Erhöhung von CD86 auf DCs der Haut in CD73KO-Mäusen ebenfalls bereits gezeigt [107].

Auch bei der Untersuchung der Zellen des adaptiven Immunsystems konnten mit der Tendenz zu einer geringeren Menge an T-Zellen und einer tendenziellen Erhöhung der B-Zellen bei CD73KO-Mäusen analoge Daten zu den Studien an B7H1-Mäusen erhoben werden

[105]. Bei den Messungen der Untergruppen der T-Zellen zeigten sich schließlich eine Vielzahl von statistisch signifikanten Veränderungen und Verschiebungen. Während NKT-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, sowie deren Subpopulationen T_{naive}, T_{effector} und T_{memory} zahlenmäßig unter den beiden Mausgruppen keinerlei signifikante Unterschiede aufwiesen, zeigte sich bei den CD4⁺ T-Zellen ein gänzlich anderes Bild. Auf der einen Seite reduzierte sich tendenziell die Anzahl der CD4⁺ T_{memory}, wohingegen sich gleichzeitig die Anzahl der CD4⁺ T_{effector} bei CD73KO-Mäusen erhöhte. Hierbei könnten die Veränderungen der Blutserumkonzentration des IL-6 eine Rolle spielen, da dieses Einflüsse auf die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen hat [108], sowie vermutlich einen Effekt auf die Ausprägung des memory/effector Phänotyps hat [109, 110]. Die in der Einleitung erwähnte Hemmung der T-Zell-Differenzierung über den A2A-Rezeptor[19] fügt sich ebenfalls sehr gut in dieses Bild, da durch den CD73 KO und eine Reduzierung des aktiven Adenosins eine verminderte Aktivierung dieses Rezeptors eine Verschiebung in der Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen plausibel erscheinen lässt.

Bei den weiteren Subpopulationen von CD4⁺ T-Zellen zeigte sich bei CD73KO-Mäusen, dass die T_{reg} in ihrer Zahl zurückgingen und sich gleichzeitig die Anzahl der T_{con} vergrößerte. Wie in der Einleitung beschrieben, ist bekannt, dass die T_{reg} sich zahlenmäßig durch eine Aktivierung des A2A-Rezeptors erhöhen [39, 40], was diese Verschiebung des T_{reg}/T_{con} Verhältnisses zugunsten der T_{con} plausibel erscheinen lässt. Durch den Mangel an Adenosin und somit einer verminderten Aktivierung des A2A-Rezeptors, kommt es im Umkehrschluss so zu einer Verminderung der Anzahl der T_{reg}.

Zusammenfassend zeigen diese Erkenntnisse aus der Immunophänotypisierung von gesunden Mäusen ein teils deutlich verändertes immunologisches Profil der CD73KO-Mäuse. Am bedeutendsten sind hier die prozentuale Reduktion der T_{reg} und die Verschiebungen im Verhältnis der CD4⁺ T_{effector}/T_{memory}-Zellen bei den CD73KO-Mäusen, was beides durch die verminderte Aktivierung des A2A-Rezeptors begründet sein könnte.

Bei der Tumorimplantation von Zellen der Panc02 Zelllinie in das Pankreas von Wildtyp- und CD73KO-Mäusen sollte das eingangs aufgeführte, verbesserte immunologische Potential der KO-Mäuse zur Abwehr von Tumoren bestätigt und genauer untersucht werden. Die Tatsache, dass CD73KO-Mäuse nach 30 Tagen generell weniger Tumoren und zusätzlich im Schnitt deutlich reduzierte Tumorumfänge aufwiesen, passt sehr gut zu den aktuellen

wissenschaftlichen Beobachtungen der positiven Eigenschaften eines CD73 Knockouts [61-63].

Bei der Auswertung der immunologischen Zellen, die sich jeweils in den Milz- und Tumoreinzelsuspensionen der Versuchstiere nachweisen ließen, zeigte sich, dass tumortragende CD73KO-Mäuse in den Milzen weniger Lymphozyten aufwiesen, als CD73KO-Mäuse, die keinen Tumor entwickelten. Dies erklärt sich am besten durch eine Migration der Lymphozyten aus der Milz in den Tumor. Trotz alledem ließen sich generell in Milzen mehr Lymphozyten als in Tumoren nachweisen.

Das selbige Bild zeigte sich auch für CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, die aus den Leukozyten identifiziert wurden. Auch hier zeigten tumortragende CD73KO-Mäuse generell mehr dieser Zellen in den Milzen als Mäuse, die im definierten Zeitraum keinen Tumor entwickelt haben. Auch hier ist es gut vorstellbar, dass eine Migration der Zellen zum Ort des Geschehens, dem Tumor, stattgefunden hat. Ebenfalls waren dennoch in den jeweiligen Milzen mehr dieser Zellen aufzufinden verglichen mit den Tumoren. In beiden Fällen hätte man erwarten können, dass die massive Migration der Lymphozyten respektive TILs in den Tumor, ein gegenteiliges Bild zeichnen würde und sich somit messbare Unterschiede in der Menge der Lymphozyten in den Tumoreinzelsuspensionen zeigen lassen. Unterschiede in der Menge der Lymphozyten, CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zwischen Wildtyp- und CD73KO-Mäusen waren wider Erwarten weder in den Tumoren noch in den Milzen tumortragender Mäuse aufzufinden. Dies hätte mit einer erhöhten immunologischen Zelldichte die verbesserte Tumoralabwehr der CD73KO-Mäuse erklärt. An dieser Stelle kann man also festhalten, dass das deutlich verbesserte Potential der CD73KO-Mäuse sich gegen Tumoren zu wehren, nicht in der absoluten Menge der Lymphozyten und ihrer hier gemessenen Untergruppen begründet ist, sondern entweder durch andere hier nicht ermittelte Zellen oder das individuelle Potential der gemessenen Zellen selbst sich immunologisch aktiv zu zeigen.

Sowohl die Zellen der Milzeinzelsuspensionen der Mäuse aus dem Tumorversuch als auch die der Tumoreinzelsuspensionen wurden zunächst dahingehend überprüft, ob sie sich erfolgreich in ihrer IFN γ -Produktion stimulieren lassen. Dies lies erstens Rückschlüsse darüber zu bis zu welchem Maß sie sich stimulieren lassen, diente aber auch dazu eine ratio aus den Werten der stimulierten zu denen der unstimulierten Proben zu erstellen. Diese

ratio stellt ein Maß dar, inwieweit die jeweilige Immunzelle das Potential hat, ihre IFN γ -Produktion auf einen Stimulus hin zu steigern.

Auffallend war, dass die Basalwerte des IFN γ aus Milzeinzelsuspensionen bei CD73KO-Mäusen auf allen Ebenen, also Leukozyten, Lymphozyten und CD4⁺ T-Zellen niedriger waren, nicht jedoch bei den CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu waren die Basalwerte des IFN γ aus Tumoreinzelsuspensionen bei CD73KO-Mäusen nur auf einer Ebene, den CD8⁺ T-Zellen aus den Leukozyten, unterschiedlich und zwar erhöht. Gerade dieses Ergebnis deckt sich sehr gut mit den allgemeinen Beobachtungen bei vergleichbaren Tumormodellen, bei denen mehrfach die verbesserte Tumorabwehr mit einer erhöhten IFN γ -Produktion [61, 62], speziell durch CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden konnte [63-65].

Bei den erstellten ratios aus stimulierten zu unstimulierten Proben wurde ein deutlich verbessertes Potential zur Steigerung der IFN γ -Produktion der TILs bei CD73KO-Mäusen deutlich. So zeigten sich bei diesen Mäusen tendenziell erhöhte ratios im Falle von Lymphozyten, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen aus den Leukozyten und eine signifikant erhöhte ratio bei den CD8⁺ T-Zellen. Im Kontrast hierzu zeigten sich bei den gleichermaßen erstellten ratios aus den Werten der Milzeinzelsuspensionen keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Mauspopulationen. Dies zeigt deutlich, dass bei den CD73KO-Mäusen ausschließlich jene Zellen ein gesteigertes Potential aufweisen, welche sich bereits im Bereich des Tumors aufhalten. Hier entfalten die immunologischen Zellen der CD73KO-Mäuse wohl ihr gesteigertes Potential gemessen an der ratio ihre IFN γ -Produktion im Gegensatz zu den Wildtypmäusen zu erhöhen. Dieser Umstand ist unter anderem eine mögliche Erklärung, weshalb die Knockoutmäuse eine verbesserte Tumorabwehr zeigen und deckt sich erneut mit den Beobachtungen anderer Autoren, die durch Ausschaltung von CD73 oder Adenosinrezeptoren erhöhte IFN γ -Werte vorfanden [61, 63-65]. Auch in ähnlichen Versuchen zu dem Immuncheckpointmolekül CTLA-4 konnte durch dessen Ausschaltung gezeigt werden, dass dies ebenso in einem erhöhten IFN γ -Level resultierte [111].

Bei der Gegenüberstellung der Basal-IFN γ -Werte, sowie der ratios aus den Milzeinzelsuspensionen von tumortragenden und nicht tumortragenden CD73KO-Mäusen zeigten sich erwartungsgemäß und passend zu den vorherigen Beobachtungen, keine Unterschiede. Dies bestärkt die zuvor gestellte Annahme, dass sich das Maß der potentiellen

immunologischen Potenz nicht anhand der Immunzellen in den Milzen der Versuchstiere ablesen lässt, sondern ausschließlich direkt im Tumor. Die Zellen vor Ort sind wohl durch einen noch unbekannten Mechanismus bereits „voraktiviert“ und dieser Zustand bedarf sicherlich weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

Abschließend haben wir noch die zuvor gemessenen Tumorzellvolumina in Korrelation zu den jeweils ermittelten Basal-IFN γ -Werten und stimulierten IFN γ -Werten aus jeweils den Milz- und Tumoreinzelsuspensionen gesetzt. Dies sollte einen möglichen Zusammenhang der IFN γ -Produktion und der Verringerung des Tumorzellvolumens zeigen. In vitro Versuche an Pankreastumorzelllinien haben hier gezeigt, dass die Proliferation der Tumorzellen durch Zugabe von IFN γ stark eingeschränkt ist bzw. teils völlig zum Erliegen kommt [112]. Ob diese Korrelation positiv oder invers zu erwarten war, konnte man zuvor nicht genauer definieren. Einerseits könnte man argumentieren, dass höhere IFN γ -Werte bedeuten, dass das Tumorzellvolumen geringer ausfallen müsste, da die immunologischen Zellen vermehrt in der Lage waren den Tumor zu bekämpfen. Andererseits könnte man auch erwarten, dass hohe IFN γ -Werte mit einem höheren Tumorzellvolumen korrelieren, da die immunologischen Zellen zum Zeitpunkt der Probennahme der massiveren Tumorzelllast durch eine Steigerung der IFN γ -Produktion entgegenwirken mussten.

Wie zu erwarten, zeigte sich bei den Basal-IFN γ -Werten aus Milzeinzelsuspensionen kaum eine Korrelation zwischen diesen und dem Tumorzellvolumen. Wie zuvor beschrieben entstand diese Erwartung, da die Immunzellen in den Milzen aller verglichenen Tiere kaum unterschieden und somit keine Veränderungen durch die Anwesenheit eines Tumors erfahren haben. Lediglich bei den Mäusen des Wildtyps zeigte sich eine positive Korrelation aus den stimulierten IFN γ -Werten der Lymphozyten und der CD4⁺ T-Zellen mit dem Tumorzellvolumen. Diese Beobachtung ist nur schwerlich zu erklären und fällt eher in die Kategorie Zufallsbefund, als dass sie wissenschaftliche Relevanz hätte.

Im Falle der Tumoreinzelsuspensionen erwarteten wir hingegen aufgrund der vorherigen markanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und CD73KO-Mäusen eine wahrscheinliche Korrelation der Variablen.

Bei den unstimulierten Basal-IFN γ -Werten zeigten ausschließlich die CD73KO-Mäuse auf Ebene der Leukozyten und der CD4⁺ T-Zellen eine positive Korrelation der IFN γ -Werte mit

dem Tumorzellen. Bei zuvor stimulierten Proben zeigte sich hingegen ein umso deutlicheres Bild. Wildtypmäuse zeigten nur auf Ebene der CD4⁺ T-Zellen eine positive Korrelation der stimulierten IFN γ -Werte zum Tumorzellen der jeweiligen Maus. Bei den Knockoutmäusen hingegen zeigte sich auf allen gemessenen Ebenen, außer den CD4⁺ T-Zellen eine deutliche positive Korrelation aus stimulierten IFN γ -Werten und Tumorzellen der jeweiligen Maus.

Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass die Immunzellen von CD73KO-Mäusen deutlich besser am Ort des Tumors ihre IFN γ -Produktion mit gesteigertem Tumorzellen anpassen/steigern können und sind somit eine weitere plausible Erklärung für die günstigere Tumorzellen dieser Mäuse, da wie mehrmals in dieser Arbeit erwähnt die IFN γ -Produktion entscheidenden Anteil am Vermögen zur Abwehr eines Tumors hat [61-65].

Zusammenfassend für diesen Teil der Experimente ist festzuhalten, dass bemerkenswert ist, in welchem Umfang sich CD73KO-Mäuse erfolgreich gegen die Entwicklung eines implantierten Tumors wehren können und wie signifikant kleiner die Volumina der -wenn überhaupt entstandenen- Tumoren im Vergleich zu den Wildtypmäusen ausfallen. Die Menge der Immunzellen in den gemessenen Geweben variiert zwar im Großen und Ganzen zwischen den Mausvergleichsgruppen nur geringfügig und auch die Messungen der IFN γ -Werte in Milzeinzelsuspensionen zeigten, dass sich die messbaren Unterschiede dieser zwei Mausarten nicht in diesem Organ abspielt. Sehr interessant war jedoch zu beobachten, dass sich sowohl die ratios der IFN γ -Werte und die Korrelation der stimulierten IFN γ -Werte mit dem Tumorzellen bei den CD73KO-Mäusen merklich von den ermittelten Werten der Mäuse des Wildtyps unterschieden. Diese Tatsache bietet definitiv eine Erklärung für das allgemein verbesserte Potential zur Tumorzellen dieser KO-Mäuse, da IFN γ bekanntermaßen auf mehreren Ebenen antitumoral wirkt. Hierbei wirkt das IFN γ antiproliferativ auf die Tumorzellen, kann Tumorzellapoptose induzieren, aktiviert APC mehr Zytokine und kostimulatorische Moleküle zu exprimieren und inhibiert die Funktion von T_{reg} und MDSC [113]. Dennoch bedarf dies weiterer wissenschaftlicher Forschungen zur Ergründung der genauen Zusammenhänge der gesteigerten IFN γ -Werte und dem Knockout des CD73. Wir können an dieser Stelle nur vermuten, dass dies erneut über den A2A-Rezeptor geschieht, da die Aktivierung dessen eine Verminderung der IFN γ -Produktion von CD4⁺ T-Zellen bewirkt [49]. Durch den Knockout des CD73 kommt es durch weniger aktives

Adenosin zu einer reduzierten Aktivierung dieses Rezeptors und im Umkehrschluss zu einer erhöhten IFN γ -Produktion.

Abschließend wollten wir in dieser Arbeit noch die Einflüsse verschiedener Zytokine auf die Expression des CD73 auf CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B-Lymphozyten zeigen. Da wie eingangs erläutert der Überstand von Panc02-Zellen in Kultur einen erhöhenden Effekt auf die CD73-Expression bewirkt, wurden die mengenmäßig am meisten ausgeprägten Zytokine in diesem Überstand für dieses Experiment verwendet.

Hierbei zeigte sich, dass keines der verwendeten Zytokine einen senkenden oder erhöhenden Einfluss auf die Expression des CD73 auf den untersuchten Zellen hat. Bei der Verwendung von VEGF zeigte sich in sehr hohen Konzentrationen von 1 und 10 ng gar eine Reduzierung des MFI und der prozentualen Menge an CD73 auf CD4⁺ T-Zellen. Da Adenosin nachweislich die Produktion von VEGF stimuliert [35-37], kommt es bei sehr hohen Konzentrationen von VEGF wohl zu einer Gegenregulation und somit zu einer Reduzierung des CD73, um die Menge an VEGF-stimulierendem Adenosin zu kontern.

Bei allen Versuchen mit den verschiedenen Zytokinen fiel auf, dass sich die gemessenen Werte der CD73-Expression zwischen dem Ausgangswert an Tag 0 und der unbehandelten Negativkontrolle von Tag 2 in zwei Punkten stets nach gleichem Muster veränderten. Die CD73-Expression der CD8⁺ T-Zellen reduzierte sich und die der B-Lymphozyten erhöhte sich durch zwei Tage in Kultur. Dieser Umstand erscheint verwirrend und kann am ehesten durch Stress, welche die Zellen möglicherweise während der Zeit im Medium in den Wells erfahren erklärt werden.

Die Tatsache, dass zwar der Überstand der Panc02-Zellen in der Lage ist die CD73-Expression zu erhöhen, jedoch nicht die einzelnen gemessenen Zytokine des Überstands in unseren Versuchen dazu in der Lage waren, lässt zweierlei Theorien entstehen. Einerseits ist es möglich, dass nur ein Zusammenspiel gewisser Zytokine diesen CD73-erhöhenden Effekt auf die Immunzellen auslösen kann oder andererseits nicht ermittelte Inhaltsstoffe des Panc02-Überstands für diesen Effekt verantwortlich sind. In beiden Fällen sind weitere wissenschaftliche Nachuntersuchungen zur Ergründung dieses Phänomens erforderlich, um den CD73-erhöhenden Effekt der Panc02-Zellen zu belegen, da dieser eine potentielle Immunsuppression über die CD73-bedingte Erhöhung des Adenosins auslöst.

CD73 repräsentiert alles in allem eine ausgesprochen vielversprechende Stellschraube des Immunsystems, die definitiv das Potential hat, eine mögliche Verbesserung der Therapiechancen bei Tumorerkrankungen zu etablieren. Das immunsuppressive Potential von CD73 ist derart umfangreich, dass eine weitere Erforschung der Ausschaltung dieses Enzyms, sei es durch Knockout oder neutralisierende Antikörper, letztlich einen wünschenswerten Fortschritt im Bereich der Immunotherapie ergeben könnte.

Aus rein veterinärmedizinischer Sicht ist CD73 noch weitestgehend unerforscht, jedoch wird es zur Identifizierung von mesenchymalen Stromazellen bei Studien an Hunden und Schafen eingesetzt [114-116]). Auch wenn bis dato noch keine umfangreichen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur CD73-Expression der Immunzellen unserer Haustiere existieren, so ist es ausgehend von den Daten an Mensch und Maus, sowie deren physiologischer Gemeinsamkeiten, doch wahrscheinlich, dass CD73 in unseren Haustieren ähnlich präsent und relevant ist. Daher sind weitere Untersuchungen an diesem Enzym auch aus veterinärmedizinischem Interesse sinnvoll und für ein besseres Verständnis der Rolle des CD73 im Tumorgeschehen sicherlich notwendig.

Jede Manipulation an den körpereigenen Mechanismen der Selbstregulierung birgt natürlich Risiken einer überschießenden Immunantwort gefolgt durch selbstzerstörerische Autoimmunprozesse. Die Tatsache, dass wir und auch andere Autoren die mit der Ausschaltung des CD73 forschten, kaum negative phänotypische Veränderungen im *in vivo* Mausmodell feststellen konnten, lässt zumindest die Hoffnung zu, dass derartige Komplikationen, bei der Entwicklung von Immunotherapeutika auf Basis der CD73-Ausschaltung, ausbleiben.

7 Zusammenfassung

(Thomas Adam, 2020)

Physiologische Effekte eines CD73 Knockouts – Immunophänotypisierung von gesunden Mäusen und die Rolle des CD73 in der immunologischen Abwehr eines orthotop injizierten Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom stellt in der heutigen Zeit eine der aggressivsten und am schwersten diagnostizierbaren Tumorarten dar, was mit einer sehr schlechten Prognose für die betroffenen Menschen einhergeht. Die Immunotherapie macht derzeit in der Onkologie stetig vielversprechende Fortschritte und bietet daher einen interessanten Ansatz zur Erforschung der immunologischen Hintergründe, weshalb ein Tumor überhaupt erst entstehen und dem Immunsystem entkommen kann. Das ecto-Enzym CD73 repräsentiert hier mit seinen immunsuppressiven und proangiogenetischen Eigenschaften über die Bildung von extrazellulärem Adenosin ein zentrales Checkpointmolekül, welches von unterschiedlichen Immunzellen überexprimiert und gegen die Tumorimmunantwort genutzt wird. Anhand einer umfangreichen Immunophänotypisierung von gesunden CD73KO- und Wildtypmäusen haben wir die immunologischen Unterschiede durch ein Fehlen des CD73 erforscht. CD73KO-Mäuse zeigen unter anderem eine reduzierte IL-6 Serumkonzentration, eine Reduktion der (aktivierten) NK-Zellen, sowie der pDCs. Außerdem kommt es durch den Knockout zu einer Verschiebung der Subpopulationen von CD4⁺ T-Zellen hin zu einer größeren Anzahl an T_{effector} und die Menge der T_{reg} reduziert sich. Bei der orthotopen Tumorimplantation von Zellen der pankreatischen Tumorzelllinie Panc02 in Wildtyp- und CD73KO-Mäuse ergeben sich bei den KO-Mäusen signifikant geringere Tumorfrequenz sowie –volumina. Bei der Messung des IFN γ in Milz- und Tumoreinzelsuspensionen dieser Mäuse zeigt sich, dass in Milzen generell kaum Unterschiede durch den KO entstehen, wohingegen die TILs der KO-Mäuse auf Stimulation mit teils deutlich höherer IFN γ -Produktion reagieren als jene der Vergleichsmäuse. Außerdem kann man bei CD73KO-Mäusen im Gegensatz zu Wildtypmäusen eine deutliche positive Korrelation aus Tumolvolumen und stimulierter IFN γ -Produktion der TILs detektieren. Schließlich konnten wir zeigen, dass die prozentuale CD73-Expression auf Immunzellen in vitro nicht von den Zytokinen des Zellkulturüberstands von Panc02 steigt. Jedoch beeinflusst die Dauer von 48h in Kultur ohne Behandlung die CD73-Expression merklich, da sich die CD73-Expression von CD8⁺ T-Zellen stets verringert und die der B-Zellen erhöht. Das immunsuppressive Potential

von CD73 ist derart umfangreich, dass eine weitere Erforschung der Ausschaltung dieses Enzyms, sei es durch Knockout oder neutralisierende Antikörper, letztlich einen wünschenswerten Fortschritt im Bereich der Immuntherapie ergeben könnte.

8 Summary

(Thomas Adam, 2020)

Physiological effects of a CD73 knockout - Immunophenotyping of healthy mice and the role of CD73 in a model of murine orthotopic pancreatic cancer

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is currently one of the most aggressive and difficult to diagnose types of tumors, with a very poor prognosis for affected people. At the same time, immunotherapy is making steady progress in oncology and therefore offers an interesting approach to the study of the immunological background, why a tumor can arise in the first place and escape the immune system. The ecto enzyme CD73, with its immunosuppressive and proangiogenic properties, represents a central checkpoint molecule through the formation of extracellular adenosine, which is overexpressed by different immune cells and used against the tumor immune response. Based on extensive immunophenotyping of healthy CD73KO and wild type mice, we have explored the immunological differences due to a lack of CD73. Among other things, CD73KO mice show a reduced IL-6 serum concentration, a reduction of the (activated) NK cells, as well as the pDCs. In addition, the knockout results in a shift in the subpopulations of CD4⁺ T cells to a greater number of T_{effectors} and the amount of T_{reg} is reduced. In the orthotopic tumor implantation of cells of the PDAC cell line Panc02 in wild-type and CD73KO mice, the KO mice show significantly lower tumor frequencies and tumor volumes. When measuring the IFN γ in spleen and tumor suspensions of these mice, it is found that in spleens, there are generally barely differences due to the KO, whereas the tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) of the KO mice respond to stimulation with partly significantly higher IFN γ production than the control mice. In addition, in CD73KO mice, in contrast to wild-type mice, a clear positive correlation can be detected from tumor volume and stimulated IFN γ production of the TILs. Finally, we were able to show that the percent CD73 expression on immune cells in vitro does not increase from the cytokines of the cell culture supernatant of Panc02. However, the 48 hours in culture without treatment significantly affect CD73 expression, as the CD73 expression of CD8⁺ T cell always decreases, while that of B cells increases. The immunosuppressive potential of CD73 is so extensive that further research into the elimination of this enzyme, whether by knockout or neutralizing antibodies, could ultimately result in desirable advances in immunotherapy.

9 Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Travers P, Walport M, Seidler L, Haüßer-Stiller I. Janeway Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
2. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2008;181(8):5791-802.
3. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*. 2016;7:12150.
4. Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008;111(8):4233-44.
5. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer immunology research*. 2017;5(1):3-8.
6. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines*. 2016;4(4):36.
7. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2009;58(1):49-59.
8. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:292.
9. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(4):687-92.
10. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PWM, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*. 2010;95(1):135-43.
11. Nicodemus CF. Antibody-based immunotherapy of solid cancers: progress and possibilities. *Immunotherapy*. 2015;7(8):923-39.
12. Blattman J, D Greenberg P. *Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses* 2004. 200-5 p.
13. Fellner C. Ipilimumab (yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: serious side effects and a hefty price tag may limit its use. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. 2012;37(9):503-30.
14. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(26):2517-26.
15. Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends in cancer*. 2016;2(2):95-109.
16. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal*. 1992;285(Pt 2):345-65.
17. Sträter N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signalling*. 2006;2(2):343-50.
18. Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD 73. *Immunological Reviews*. 2006;161(1):95-109.
19. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T Regulatory and Primed Uncommitted CD4 T Cells Express CD73, Which Suppresses Effector CD4 T Cells by Converting 5'-Adenosine Monophosphate to Adenosine. 2006;177(10):6780-6.
20. Shevchenko I, Bazhin AV, Umansky V. Comment on “Adenosinergic Regulation of the Expansion and Immunosuppressive Activity of CD11b⁺Gr1⁺ Cells”. 2012;188(7):2929-30.

21. Heine P, Braun N, Sévigny J, Robson SC, Servos J, Zimmermann H. The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *European Journal of Biochemistry*. 2003;268(2):364-73.
22. Trautmann A. Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a "Danger Signal". 2009;2(56):pe6-pe.
23. Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;112(2):358-404.
24. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(7):993-1002.
25. Xu S, Shao Q-Q, Sun J-T, Yang N, Xie Q, Wang D-H, et al. Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro-Oncology*. 2013;15(9):1160-72.
26. Haskó G, Cronstein B. Regulation of Inflammation by Adenosine. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:85.
27. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*. 2004;25(1):33-9.
28. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Molecular Aspects of Medicine*. 2017;55:9-19.
29. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*. 2013;19(6):355-67.
30. St. Hilaire C, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, et al. NT5E Mutations and Arterial Calcifications. *The New England journal of medicine*. 2011;364(5):432-42.
31. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Toczek M, Smolenski RT, Slominska EM. The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacological Reports*. 2015;67(4):675-81.
32. Ohta M, Toyama K, Gutterman DD, Campbell WB, Lemaître V, Teraoka R, et al. Ecto-5'-nucleotidase, CD73, is an endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(3):629-36.
33. Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(5):783-96.
34. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, et al. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(11):1395-405.
35. Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ. Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. 1988;255(3):H554-H62.
36. Böring YC, Flögel U, Jacoby C, Heil M, Schaper W, Schrader J. Lack of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes arteriogenesis. *Cardiovascular Research*. 2013;97(1):88-96.
37. Auchampach JA. Adenosine receptors and angiogenesis. *Circ Res*. 2007;101(11):1075-7.
38. Linden J. Molecular Approach to Adenosine Receptors: Receptor-Mediated Mechanisms of Tissue Protection. 2001;41(1):775-87.
39. Ohta A, Sitkovsky M. Extracellular Adenosine-Mediated Modulation of Regulatory T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:304.
40. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:190.
41. Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production. 2011;187(2):676-83.

42. Ryzhov S, Novitskiy SV, Goldstein AE, Biktasova A, Blackburn MR, Biaggioni I, et al. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2011;187(11):6120-9.
43. Miller JS, Cervenka T, Lund J, Okazaki IJ, Moss J. Purine Metabolites Suppress Proliferation of Human NK Cells Through a Lineage-Specific Purine Receptor. 1999;162(12):7376-82.
44. Ernens I, Léonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;392(3):351-6.
45. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews*. 2011;63(1):1-34.
46. Montesinos MC, Desai A, Chen J-F, Yee H, Schwarzschild MA, Fink JS, et al. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *The American journal of pathology*. 2002;160(6):2009-18.
47. Chhabra P, Linden J, Lobo P, Okusa MD, Brayman KL. The immunosuppressive role of adenosine A2A receptors in ischemia reperfusion injury and islet transplantation. *Current diabetes reviews*. 2012;8(6):419-33.
48. Ferrari D, McNamee EN, Idzko M, Gambari R, Eltzschig HK. Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. *Trends in Immunology*. 2016;37(6):399-411.
49. Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Hüls S, Burghoff S, Schrader J. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011;301(2):C530-C9.
50. Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, et al. CD73 on tumor cells impairs anti-tumor T cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer research*. 2010;70(6):2245-55.
51. Blay J, White TD, Hoskin DW. The Extracellular Fluid of Solid Carcinomas Contains Immunosuppressive Concentrations of Adenosine. 1997;57(13):2602-5.
52. Wang L, Tang S, Wang Y, Xu S, Yu J, Zhi X, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2013;30(5):671-80.
53. Kosałka P, Gołńska M, Urban A, Stasiłojć G, Stanisławowski M, Majewski M, et al. Specific Activation of A(3), A(2A) and A(1) Adenosine Receptors in CD73-Knockout Mice Affects B16F10 Melanoma Growth, Neovascularization, Angiogenesis and Macrophage Infiltration. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0151420.
54. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*. 2011;118(23):6141-52.
55. Sadej R, Spychala J, Skladanowski AC. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. 2006;16(3):213-22.
56. Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS. Role of Estrogen Receptor in the Regulation of Ecto-5'-Nucleotidase and Adenosine in Breast Cancer. 2004;10(2):708-17.
57. Kazemi MH, Raoofi Mohseni S, Hojjat-Farsangi M, Anvari E, Ghalamfarsa G, Mohammadi H, et al. Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cancer. 2018;233(3):2032-57.
58. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. 2013;110(27):11091-6.
59. Umansky V, Shevchenko I, Bazhin AV, Utikal J. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2014;63(10):1073-80.
60. Takedachi M, Qu D, Ebisuno Y, Oohara H, Joachims ML, McGee ST, et al. CD73-generated Adenosine Restricts Lymphocyte Migration into Draining Lymph Nodes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2008;180(9):6288-96.

61. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemelä J, Laurila JP, Elima K, et al. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *European Journal of Immunology*. 2011;41(5):1231-41.
62. Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MCP, Möller A, Darcy PK, et al. CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis. 2012;72(9):2190-6.
63. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MWL, Darcy PK, et al. CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis. 2011;71(8):2892-900.
64. Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, et al. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(6):2371-82.
65. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MKK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(35):13132-7.
66. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1547-52.
67. Young A, Ngiow Shin F, Barkauskas Deborah S, Sult E, Hay C, Blake Stephen J, et al. Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell*. 2016;30(3):391-403.
68. Vijayan D, Barkauskas DS, Stannard K, Sult E, Buonpane R, Takeda K, et al. Selective activation of anti-CD73 mechanisms in control of primary tumors and metastases. *OncolImmunology*. 2017;6(5):e1312044.
69. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
70. Allard D, Chrobak P, Allard B, Messaoudi N, Stagg J. Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. *Immunology Letters*. 2018.
71. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016;29:7-16.
72. Allard D, Allard B, Gaudreau P-O, Chrobak P, Stagg J. CD73-adenosine: A next-generation target in immuno-oncology 2016.
73. Allard D, Turcotte M, Stagg J. Targeting A2 adenosine receptors in cancer. *Immunology & Cell Biology*. 2017;95(4):333-9.
74. Antonioli L, Blandizzi C, Malavasi F, Ferrari D, Haskó G. Anti-CD73 immunotherapy: A viable way to reprogram the tumor microenvironment. *OncolImmunology*. 2016;5(9):e1216292.
75. Antonioli L, Haskó G, Fornai M, Colucci R, Blandizzi C. Adenosine pathway and cancer: where do we go from here? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2014;18(9):973-7.
76. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology*. 2012;33(5):231-7.
77. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. 2017;36(3):293-303.
78. Gao Z-w, Dong K, Zhang H-z. The Roles of CD73 in Cancer. *BioMed Research International*. 2014;2014:460654.
79. Ohta A. A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. 2016;7(109).
80. Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000;87(2):161-73.
81. Zhang B. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer research*. 2010;70(16):6407-11.
82. Young A, Mittal D, Stagg J, Smyth MJ. Targeting Cancer-Derived Adenosine: New Therapeutic Approaches. 2014;4(8):879-88.

83. Robert-Koch-Institut. Krebs gesamt 2017 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html] [10/29/2018].
84. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2017 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c00_97_krebs_gesamt.pdf? blob=publicationFile] [10/29/2018].
85. Robert-Koch-Institut. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland 2012 [Available from: <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Praevalenzbrochuere/Lokalisationen/C25.pdf? blob=publicationFile>] [10/29/2018].
86. Robert-Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 2016 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf? blob=publicationFile] [10/29/2018].
87. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland Bauchspeicheldrüse 2017 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c25_bauchspeicheldruese.pdf? blob=publicationFile] [10/29/2018].
88. Chang H-H, Moro A, Takakura K, Su H-Y, Mo A, Nakanishi M, et al. Incidence of pancreatic cancer is dramatically increased by a high fat, high calorie diet in KrasG12D mice. PLoS ONE. 2017;12(9):e0184455.
89. Yu J, Blackford AL, dal Molin M, Wolfgang CL, Goggins M. Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. Gut. 2015;64(11):1783-9.
90. Deutsches-Krebsforschungszentrum. Bauchspeicheldrüsenkrebs 2018 [Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs.php>] [10/29/2018].
91. Root A, Allen P, Tempst P, Yu K. Protein Biomarkers for Early Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Progress and Challenges. Cancers. 2018;10(3):67.
92. Karandish F, Mallik S. Biomarkers and Targeted Therapy in Pancreatic Cancer. Biomarkers in Cancer. 2016;8(Suppl 1):27-35.
93. Robert-Koch-Institut. Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom) 2017 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html] [10/29/2018].
94. Zhang Q, Zeng L, Chen Y, Lian G, Qian C, Chen S, et al. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. Gastroenterology Research and Practice. 2016;2016:8962321.
95. Zhan H-X, Xu J-W, Wu D, Wu Z-Y, Wang L, Hu S-Y, et al. Neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Cancer medicine. 2017;6(6):1201-19.
96. Bazhin AV, Shevchenko I, Umansky V, Werner J, Karakhanova S. Two immune faces of pancreatic adenocarcinoma: possible implication for immunotherapy. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2014;63(1):59-65.
97. Bazhin AV, Bayry J, Umansky V, Werner J, Karakhanova S. Overcoming immunosuppression as a new immunotherapeutic approach against pancreatic cancer. Oncoimmunology. 2013;2(9):e25736-e.
98. Bio-Rad Laboratories I. Antibody Titration 2017 [Available from: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-antibody-titration.html>] [8/17/17].
99. Association AVMA. Cancer in Pets 2019 [Available from: <https://www.avma.org/public/PetCare/Pages/Cancer-in-Pets.aspx>] [8/10/19].
100. Oncology VSoS. Pancreatic Adenocarcinoma 2019 [Available from: <https://vssso.org/pancreatic-adc>] [8/10/19].
101. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity. 1995;3(5):541-7.

102. Blume C, Felix A, Shushakova N, Gueler F, Falk CS, Haller H, et al. Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-nucleotidase deficient mice induces renal injury. *PloS one*. 2012;7(5):e37100-e.
103. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.6(10):a016295-a.
104. Sun Y, Wu F, Sun F, Huang P. Adenosine Promotes IL-6 Release in Airway Epithelia. *The Journal of Immunology*. 2008;180(6):4173-81.
105. Bazhin AV, von Ahn K, Maier C, Soltek S, Serba S, Diehl L, et al. Immunological in vivo effects of B7-H1 deficiency. *Immunology Letters*. 2014;162(2, Part B):273-86.
106. Desrosiers MD, Cembrola KM, Fakir MJ, Stephens LA, Jama FM, Shameli A, et al. Adenosine Deamination Sustains Dendritic Cell Activation in Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2007;179(3):1884-92.
107. Silva-Vilches C, Ring S, Mahnke K. ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2581-.
108. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol*. 2009;130(1):27-33.
109. Rochman I, Paul WE, Ben-Sasson SZ. IL-6 Increases Primed Cell Expansion and Survival. *The Journal of Immunology*. 2005;174(8):4761-7.
110. Longhi MP, Wright K, Lauder SN, Nowell MA, Jones GW, Godkin AJ, et al. Interleukin-6 is crucial for recall of influenza-specific memory CD4 T cells. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e1000006-e.
111. Chen H, Liakou CI, Kamat A, Pettaway C, Ward JF, Tang DN, et al. Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOS^{hi} T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(8):2729-34.
112. Detjen KM, Farwig K, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut*. 2001;49(2):251-62.
113. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer medicine*. 2018;7(9):4509-16.
114. Cláudia Cardoso Maciel Escalhão IPR, Camila Hochman-Mendez, et al. Safety of Allogeneic Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Intraspinal Transplantation in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury. *Stem Cells International*. 2017;2017:11.
115. Ma C, Liu C, Li X, Lu T, Bai C, Fan Y, et al. Cryopreservation and multipotential characteristics evaluation of a novel type of mesenchymal stem cells derived from Small Tailed Han Sheep fetal lung tissue. *Cryobiology*. 2017;75:7-14.
116. Lin H-Y, Fujita N, Endo K, Morita M, Takeda T, Nakagawa T, et al. Isolation and Characterization of Multipotent Mesenchymal Stem Cells Adhering to Adipocytes in Canine Bone Marrow. *Stem Cells and Development*. 2016;26(6):431-40.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Extrazellulärer Abbau von ATP zu aktivem Adenosin und dessen Wirkung[16, 19, 37, 39, 40, 42, 43].....	22
Abbildung 2: Ohrmarkierung CD73KO-Mäuse.....	45
Abbildung 3: Genotypisierung von Ohrbiopsien selbst gezüchteter CD73KO Nachkommen im Alter von 6 Wochen	66
Abbildung 4: Überlebensfähigkeit von Panc02-Zellen unter simulierten OP-Bedingungen	67
Abbildung 5: Gatingstrategie des „TNK-Panel“	68
Abbildung 6: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des „TNK-Panel“	69
Abbildung 7: Gatingstrategie des „B-Zell-Panel“	70
Abbildung 8: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des „B-Zell-Panel“	70
Abbildung 9: Gatingstrategie des „T _{reg} -Panel“	71
Abbildung 10: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des „T _{reg} -Panel“	72
Abbildung 11: Gatingstrategie des „DC-MDSC-Panel“	73
Abbildung 12: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des DC-MDSC-Panels	74
Abbildung 13: Gatingstrategie des „IFN γ -Panel“	76
Abbildung 14: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des IFN γ -Panels	77
Abbildung 15: Gatingstrategie des „CD73-Panel“	78
Abbildung 16: Dotplot FACS-Bilder der Kontrollen des CD73-Panels	79
Abbildung 17: CD45 ⁺ CD3 ⁺ T-Lymphozyten in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	80
Abbildung 18: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	81
Abbildung 19: T _{reg} und (aktivierte) T _{con} in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	82
Abbildung 20: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	83
Abbildung 21: Ratio von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	84
Abbildung 22: CD45 ⁺ CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ NKT-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	85
Abbildung 23: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺ B-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	86
Abbildung 24: CD45 ⁺ CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ NK-Zellen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	87
Abbildung 25: CD45 ⁺ CD11c ⁺ CD45R ⁺ pDC in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	90
Abbildung 26: CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ cDC in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	93
Abbildung 27: MDSC in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	94
Abbildung 28: Makrophagen in der Immunophänotypisierung der Splenozyten von gesunden Mäusen.....	95
Abbildung 29: Quantifizierung ausgewählter Zytokine im Serum von gesunden Mäusen mittels BioPlex.....	96
Abbildung 30: Tumorbildung 30 Tage nach orthotoper Injektion von Panc02	97

Abbildung 31: Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von Panc02	98
Abbildung 32: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion	98
Abbildung 33: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	99
Abbildung 34: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion.....	100
Abbildung 35: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	100
Abbildung 36: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion	101
Abbildung 37 Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	102
Abbildung 38: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten in Milzen von rumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	103
Abbildung 39: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	104
Abbildung 40: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten aus CD45 ⁺ Leukozyten in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion.....	105
Abbildung 41: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten aus CD45 ⁺ Leukozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	106
Abbildung 42: Quantifizierung der CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten aus CD45 ⁺ Leukozyten in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion.....	107
Abbildung 43: Quantifizierung der CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten aus CD45 ⁺ Leukozyten in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	108
Abbildung 44: Ratio der CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ Zellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion	109
Abbildung 45: Ratio der CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	109
Abbildung 46: Ratio der CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ Zellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	110
Abbildung 47: Ratio der CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ Zellen in Tumoren und Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	110
Abbildung 48: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben	111
Abbildung 49: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben	112
Abbildung 50: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben	113
Abbildung 51: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten und stimulierten Proben.....	113
Abbildung 52: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben	114

Abbildung 53: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben	115
Abbildung 54: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben	116
Abbildung 55: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben	116
Abbildung 56: Statistischer Vergleich der ratios aus stimulierten zu unstimulierten Proben IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	117
Abbildung 57: Statistischer Vergleich der ratios aus stimulierten zu unstimulierten Proben IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren 30 Tage nach orthotoper Injektion.....	118
Abbildung 58: Statistischer Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben	119
Abbildung 59: FACS Vergleich der IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion aus unstimulierten Proben	120
Abbildung 60: Statistischer Vergleich der ratios aus stimulierten zu unstimulierten Proben IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden und nicht tumortragenden Mäusen 30 Tage nach orthotoper Injektion	121
Abbildung 61: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Wildtyp-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	122
Abbildung 62: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden CD73KO-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	122
Abbildung 63: Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden Wildtyp-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	123
Abbildung 64: Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Milzen von tumortragenden CD73KO-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	124
Abbildung 65: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von Wildtyp-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	125
Abbildung 66: Korrelation der unstimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von CD73KO-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	126
Abbildung 67: Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von Wildtyp-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	127
Abbildung 68: Korrelation der stimulierten IFN γ produzierenden Immunzellen in Tumoren von CD73KO-Mäusen mit Tumolvolumen 30 Tage nach orthotoper Injektion von 100.000 Panc02 Zellen in Pankreas	128
Abbildung 69: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13	129

Abbildung 70: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13.....	130
Abbildung 71: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-17A	
.....	131
Abbildung 72: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-17A	131
Abbildung 73: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IFNγ	
.....	132
Abbildung 74: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IFNγ	133
Abbildung 75: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13	
und TGF-β.....	133
Abbildung 76: FACS-Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit IL-13 und TGF-	
β.....	134
Abbildung 77: Statistischer Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit VEGF	
.....	135
Abbildung 78: FACS Vergleich der CD73 Expression nach zweitägiger Behandlung mit VEGF	136
Abbildung 79: Statistischer Vergleich aller Werte von Tag 0 und der Negativkontrollen von Tag 2	
aller Zytokinbehandlungen	137

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FACS-Antikörper	32
Tabelle 2: FACS-Kompensation-Beads und Stimulationspräparate	33
Tabelle 3: Laborgeräte	34
Tabelle 4: Lösungen und Flüssigkeiten	35
Tabelle 5: OP-Material	36
Tabelle 6: PCR-Reagenzien	36
Tabelle 7: Pharmaka	37
Tabelle 8: Verbrauchsmaterial	37
Tabelle 9: Zytokine	38
Tabelle 10: Bio-Plex Reagenzien	39
Tabelle 11: Software	39
Tabelle 12: Mastermix Wildtyp	46
Tabelle 13: Mastermix Mutant	46
Tabelle 14: Einstellungen Mastercycler	46
Tabelle 15: Tötungskriterien	49
Tabelle 16: Zytokinkonzentrationen	51
Tabelle 17: TNK-Panel	55
Tabelle 18: B-Zell-Panel	55
Tabelle 19: T _{reg} -Panel	55
Tabelle 20: DC-MDSC-Panel	56
Tabelle 21: IFN γ -Panel	56
Tabelle 22: CD73-Panel	56
Tabelle 23: Mengenbestimmung der Antikörper für das „TNK-Panel“, „B-Zell-Panel“ und „T _{reg} -Panel“	61
Tabelle 24: Mengenbestimmung der Antikörper für das „DC-MDSC-Panel“	63
Tabelle 25: Mengenbestimmung der Antikörper für das „IFN γ -Panel“	64
Tabelle 26: Mengenbestimmung der Antikörper für das „CD73-Panel“	65

12 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, daher gilt mein ganz besonderer Dank

- Herrn Prof. Dr. Bazhin, der mir durch sein unglaubliches Fachwissen ein gleichermaßen beeindruckender, inspirierender aber vor allem stets hilfreicher Betreuer war. Vielen Dank für das gegenseitige Vertrauen und die unglaublich schnellen Korrekturen.

- Herrn Univ.-Prof. Dr. Göbel für die selbstlose Übernahme der Dissertation und die tadellose, sowie professionelle Betreuung.

- Micha, Beatrice, Niki, Sev, Nadine, Eva und Tommi für Eure bedingungslose und unermüdliche Hilfe, durch die Ihr mir die Laborarbeit versüßt habt. Ohne Eure exzellente Einarbeitung und Hilfeleistung wäre keines dieser Experimente möglich gewesen.

- Patrick und meinen unersetzbaren Freunden. Eure Gesellschaft war die dringend notwendige Ablenkung.

- meiner Schwester Verena für ein stets offenes Ohr und dafür, dass Du mir ein mahnendes Beispiel warst, dass man Dissertationen nicht zu sehr in die Länge ziehen sollte😊.

- Elisa! Du warst stets im Privaten der Rückhalt, den man in einer solchen Phase benötigt. Deine unglaubliche Motivation und Hingabe waren mir ständig eine Inspiration und ohne Dich wäre dieses Projekt zum Scheitern verurteilt gewesen. All die Lebensabschnitte inklusive einer „gemeinsamen“ Dissertation mit dir teilen zu dürfen, macht mich glücklich. Danke für die Liebe die wir teilen und die tägliche Hilfe im Labor.

- meinen Eltern. Es ist kaum in Worte zu fassen, wie dankbar ich Euch für alles bin, was ihr mir ermöglicht habt. Eure Erziehung und Wertevorstellung haben aus mir den Menschen gemacht, der ich heute bin. Dass Ihr mir überhaupt erst das Studium ermöglicht und uns zur Dissertation abermals ein unfassbar herzerwärmendes Zuhause geboten habt, werde ich Euch nie vergessen. Ihr seid die perfekten Eltern und habt mir stets den Rückhalt gegeben und das Vertrauen geschenkt, das ein junger Mann benötigt. Danke!

- meiner Oma. Mit Deiner lustigen und direkten, aber gleichzeitig beruhigenden und herzlichen Art warst Du mir schon immer ein Vorbild.